

SBC003-yhdisteen vaikutuksen testaaminen
ikäntymiseen ja ikääntymiseen liittyvissä sairauksissa
käyttäen hiivaa malliorganismina

Jukka Kiuru

Helsingin yliopisto

Bio- ja ympäristötieteellinen
tiedekunta

PRO GRADU -TUTKIELMA

Toukokuu 2020

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution– Department Perinnöllisyystieteet
Tekijä – Författare – Author Jukka Kiuru		
Työn nimi – Arbetets titel – Title SBC003-yhdisteen vaikutuksen testaaminen ikääntymiseen ja ikääntymiseen liittyvissä sairauksissa käyttäen hiivaa malliorganismina		
Oppiaine – Läroämne – Subject Ihmisgenetiikka		
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Ikääntymiseen liittyvien biologisten ilmiöiden, kuten rappeutumisen ja sairauksien tutkiminen on ensiarvoisen tärkeää, koska näistä ilmiöistä on haittaa niin yksilölle kuin koko yhteiskunnalle. Erityisen kiinnostavaa on, jos sairaudet ja rappeutuminen pystytäisiin parantamaan tai niiden haitallisia vaikutuksia voitaisiin vähentää. Ikääntymiseen voidaan yhdistää monia vakavia sairauksia kuten hermostorappeumasairaudet, syöpä ja diabetes. Hermostorappeumasairauksille on tunnusomaista proteiiniaggregaattien muodostuminen.</p> <p>SBC003-yhdiste on luonnon yrtistä eristetty molekyyli, joka on potentiaalinen lääke hermostorappeumasairauksiin. Aikaisemmin tehdyt tutkimukset hermostorappeuma sairausmalleilla osoittavat yhdisteellä olevan voimakas konsentraatiosta riippuvainen hermosoluja suojaava vaikutus.</p> <p>Malliorganismit ovat tärkeitä, koska niillä pystytään testaamaan potentiaalisten molekyylien vaikutusta vahingoittamatta kuitenkaan ihmistä. Hiivasta on tullut mielenkiintoinen malliorganismi ikääntymisen ja ikääntymiseen liittyvien sairauksien tutkimuksessa. Monet biologiset prosessit ja aineenvaihduntareitit ovat konservoituneet hiivasta aina ihmiseen asti. Lisäksi geneettiset muutokset on helppo jäljittää. Ikääntymisen tutkimisessa leivinhiiwa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) on osoittautunut erinomaiseksi malliorganismiksi. Hiivan kronologinen ikääntyminen on osoittautunut myös hyväksi menetelmäksi tutkittaessa solujen post-mitoottista ikääntymistä. Hiivasoluissa pystytään havaitsemaan nopeasti, edullisesti ja helposti proteiiniaggregaattien aiheuttamat haitalliset vaikutukset. Käytettäessä hiivaa malliorganismina tutkimuksessa pystytään luomaan suora linkki geenien ja kemiallisten yhdisteiden välille. Hiivalla tehdyt solujen sairausmekanismien tutkimukset ovat vertailukelpoisia ihmisten sairauksien kanssa. Nämä seikat tekevät hiivasta kiinnostavan malliorganismien myös hermostorappeumasairauksien lääkeainetutkimuksessa.</p> <p>Työn tavoitteena oli selvittää, voidaanko hiivasairausmalleja käyttää SBC003-yhdisteen vaikutusten arvioimiseen hermostorappeumasairauksissa, ja onko tutkittavalla yhdisteellä pelastava vaikutus haitallisia aggregaatteja muodostavia proteiineja vastaan hiivasairausmalleissa. Lisäksi tarkoitus oli tutkia, onko SBC003-yhdisteellä vaikutusta ikääntymisestä aiheutuvaan elinvoimaisuuden heikkenemiseen hiivasoluissa.</p> <p>Tutkimuksissa käytettiin seuraavia menetelmiä ja koejärjestelyjä 1. spottitestejä ja 2. elinkiertotestejä ravistelukasvatuksina, joiden elinvoimaisuutta mitattiin näytteillä, joita puolestaan analysoitiin edelleen Bioscreen-kasvatuksia apuna käyttäen.</p> <p>Spottitestien ja elinkiertotestien tuloksien mukaan SBC003-yhdisteellä saattaa olla pelastava vaikutus haitallisia FUS-aggregaatteja vastaan hiivan ihmisen sairausmallin soluissa. Tutkimustulosten mukaan SBC003-yhdisteellä on solun elinvoimaisuutta parantava vaikutus soluihin, jotka rappeutuvat ikääntymisen seurauksena. Saatujen tulosten varmentamiseksi pitäisi elinkierotestit ja spottitestit toistaa ja lisäksi tehdä sekä geneettisiä että epigeneettisiä tutkimuksia.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords hermostorappeumasairaudet, ikääntyminen, SBC003-yhdiste, elinvoimaisuus, hiiva, kronologinen, ikääntyminen, sairausmalli		
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Juha Saarikangas		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos – Institution– Department	
Tekijä – Författare – Author Jukka Kiuru			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Testing the effect of SBC003 compound on aging and aging-related disease using yeast as a model			
Oppiaine – Läroämne – Subject genetics			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's thesis		Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Research on ageing and ageing-related biological phenomena, like degeneration and diseases is of paramount importance because of the disadvantages that arise as a result of ageing and age-related diseases at the level of the individual and the whole of society. It is of particular interest whether these diseases and degeneration can be cured or their harmful effects reduced. Many diseases, such as neurodegenerative diseases, cancer and diabetes, can be found in combination with aging. Neurodegenerative disease are characterized by the formation of protein aggregates. The SBC003-compound is derived from natural herbs and is a potential drug for neurodegenerative diseases. Previous studies on neurodegenerative disease models have showed the compound has a strong concentration-dependent neuroprotective effect.</p> <p>Model organisms are important because it is possible to test the effect of potential drug molecules, without harming humans. Yeast has become an interesting model organism in the study of ageing and ageing-related diseases. Many biological processes and metabolic pathways which can also be linked to neurodegenerative diseases have been conserved from yeast to humans. Many yeast genes are conserved in human genes. In addition, genetic changes are easy to trace in yeast. In ageing research, baking yeast has proven to be an excellent model organism. The chronological ageing of yeast has also proved to be an excellent model for studying the post-mitotic ageing of cells. Yeast cells are able to demonstrate rapidly, inexpensively and easily the harmful effects of protein aggregates. When using yeast as a model organism in research, a direct link can be created between genes and chemical compounds.</p> <p>Using yeast to study cell mechanisms related to disease is comparable to studying human diseases. These factors also make yeast a significant model in the studying of drugs to treat neurodegenerative diseases.</p> <p>The aim of this Master's thesis project was to find out whether yeast disease models can be used to evaluate the effects of the SBC003- compound on the neurodegenerative diseases does SBC003 have a rescue effect against protein forming toxic aggregates in yeast disease models. We also wanted to study whether SBC003 has a effect on ageing-induced loss of vitality in yeast cells.</p> <p>In our studies, we used the following methods and test arrangements: (1) spot tests and (2) life span analyses as shaking cultures, the vitality of which was measured by means of samples that were further analysed using Bioscreen cultures.</p> <p>According to the result of our spot tests and life spam analyses, the SBC003- compound may have a rescue effect on toxic FUS aggregates in cells of the yeast model for human disease. In addition, we found that the SBC003- compound has an effect that improves the vitality of ageing cells. To confirm the results obtained, life span analyses and spot tests should be repeated as well as to make genetic and epigenetic studies.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords neurodegenerative diseases, ageing, SBC003 compound, vitality, yeast, chronological ageing			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Juha Saarikangas			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO	1
1.1 Proteiinien laskostuminen soluissa ja hermostorappeumasairaudet.....	2
1.2 Hiiva malliorganismina	4
1.2.1 Hermostorappeumasairaudet ja hiiva hermostorappeumasairauksien malliorganismina	6
1.2.1.1 Parkinsonin tauti ja hiiva α -synukleiini sairausmalli.....	7
1.2.1.2 Alzheimerin tauti ja hiiva β -amylaasisairausmalli	8
1.2.1.3 ALS- ja FTDL-sairaudet sekä hiiva TDP-43-sairausmalli	9
1.2.1.4 ALS- ja FTDL-sairaudet sekä hiiva FUS-sairausmalli.....	10
1.2.1.5 Huntingtonin tauti ja hiiva HTT-sairausmalli	12
1.3 Hiiva ikääntymisen malliorganismina.....	13
1.3.1 Spottitestit.....	14
1.3.2 Elinkiertotestit ja kineettiset testit	14
1.4 Ikääntymiseen liittyvät geenit	15
1.5 SBC003-yhdiste.....	16
2 TYÖN TAVOITTEET	18
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	19
3.1 SBC003-yhdisteen esivalmistelu.....	19
3.1.1 Kasvualustat	19
3.2 Spottitestit.....	19
3.2.1 Induktiospottitestit.....	20
3.2.2 Spottitesti SBC003-yhdisteen vaikutuksen testaamiseksi	20
3.3 Bioscreen-laite.....	21
3.4 Elinkiertotestit	22
3.5 Käytetyt hiivakannat.....	26
3.5.1 α -synukleiinihiivakanta	27
3.5.2 β -amylaasihiivakanta.....	28
3.5.3 HTT-hiivakanta	28
3.5.4 TDP-43-hiivakanta	28
3.5.5 FUS-hiivakanta.....	29
4 TUTKIMUSTULOKSET JA TOTEUTUS	30
4.1 Spottitestien tulokset	30
4.1.1 Induktiospottitestien tulokset.....	30
4.1.2 SBC003-yhdisteen vaikutuksen arvioimiseksi tehtyjen spottitestien tulokset.....	30
4.2 Elinkiertotestit	32

4.2.1 Elinkiertotesti I	32
4.2.1.1 α -synukleiinisairausmalli	33
4.2.1.2 FUS-sairausmalli.....	39
4.2.2 Elinkiertotesti II.....	44
5 POHDINTAA JA JOHTOPÄÄTÖKSET	48
5.1 Spottitestit.....	48
5.2 Elinkiertotestit	48
5.2.1 Elinkiertotesti I α -synukleiinisairausmalli.....	50
5.2.2 Elinkiertotesti I FUS-sairausmalli	51
5.3 SBC003-yhdisteen vaikutusten arviointi solujen ikääntymiseen	51
5.4 Tilastollinen arviointi	52
5.5 Virhelähteiden arviointi.....	53
5.6 Yhteenveto SBC003-yhdisteen vaikutusten arvioinnista	54
6 KIITOKSET	58
7 LÄHDELUETTELO.....	59

LYHENTEET

A β -25-35	amyloidi beta amylaasi, joka on 25-35-aminohapon pituinen.
A β -42 / A β 1-42	amyloidi beta amylaasi, joka on 42 aminohapon pituinen.
AD	Alzheimerin tauti
ade	adenosiini nukleosidi
(alpha) α -synukleiini	proteiini peptidi, jota esiintyy Parkinsonin taudissa.
ALS	amyotrofinen lateraaliskleroosi sairaus
ALS-FTD	amyotrofinen lateraaliskleroosi- otsa-ohimolohkorappeuma sairaus
APP	β -amylaasi-esiaste-proteiini
auc_e	kuvaa kasvukäyrän kokonaispinta-alaa. Ohjelma summaa lukuun kaikkien empiiristen mittaustulosten arvot ja laskee kuvaajan alle jääneen pinta-alan.
auc_I	logistisen käyrän (yleinen populaation kasvukäyrä) alle jäänyt pinta-ala. Ohjelma ottaa integraalin logistisesta yhtälöstä ja laskee käyrän alle jääneen pinta-alan. Auc_I yhdistää arvot k , r , ja N_0 samaan lukuun. Luku kuvaa myös kasvuston kasvupotentiaalia.
(beta) β -amylaasi	Alzheimerin taudissa esiintyvä proteiini.
Ca ²⁺	kahden arvoinen kalsiumioni
CAG	sytosiini-adeniini-guaniini-nukleotidit
can	kanamysiini antibiootti
CEN-FUS-YFP	hiivan fluoresoiva proteiini CEN-FUS
CFTR	geeni, joka tuottaa solukalvon ja kloridi-kanavan proteiinia
C-terminaalinen pää	tämä on proteiinin pää, johon se katsotaan loppuvan.

ddPCR	digitaalinen pisara PCR eli mRNA:n muodostumisen määrää mittaava polymeraasiketjureaktio
ER	endoplasmakalvosto
ERC	ylimääräiset kromosomaaliset-DNA-renkaat, Extrachromosomal rDNA circles
<i>FOB1</i>	FOB1-proteiinia koodaava geeni, joka on yhdistetty hiivan ikääntymiseen. Geenituote estää replikaatiohaarukan liikkumista.
Fob1	FOB1-proteiini. Estää replikaatiohaarukan liikkumista.
FTLD	otsa-ohimolohkorappeuma sairaus
FTLD-U	otsa-ohimolohkorappeuma sairaus, jonka aggregaateista löytyy ubikitonikappaleita.
<i>FUS</i>	geeni, jonka proteiinituote on fuusioitunut sarkoomassa.
FUS	proteiini on fuusioitunut sarkoomassa.
(gamma)γ-sekretaasi	proteiinientsyymi, joka pilkkoo APP-proteiineja.
Gal	galaktoosi, C ₆ H ₁₂ O ₆ , on biologisesti tärkeä sokeri.
<i>GFP</i>	geeni, joka koodaa vihreää fluoresoivaa proteiinia
GFP	vihreä fluoresoiva proteiini
HDAC1	histonien deasetylaatientsyymi
his	histidiini aminohappo
<i>HSF1</i>	lämpöshokki transkriptiotekijöitä koodaa geeni
HSF1	Lämpöshokkiproteiini transkriptiotekijä 1, Heat shock factor 1.
<i>HSP1</i>	geeni, joka koodaa lämpöshokkiproteiini 1:tä.
HSP1	lämpöshokkiproteiini 1
Htt	Huntingtonin taudissa esiintyvä proteiini
<i>Htt-72Q</i>	Huntingtonin geeni, jossa 72-polyglutamaattia koodaavaa sekvenssiä.

IBMPFD	kappalemyopatia, joka on yhdistetty Pagetin sairauteen ja etuaivolohkon dementiaan. (Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia).
IPSC	indusoitu pluripotentti kantasolu, induced pluripotent stem cells.
K	suurin mahdollinen määrä mitä populaatio voi kasvaa tässä ympäristössä. Tämä on kasvatuksen kantokyky eli teoreettinen kasvun maksimi.
kDa	kilodaltoni
leu	leusiini aminohappo
lncRNA	pitkä ei koodaava RNA
Mb	miljoona emäsparia
μM	mikromolaarinen
miRNA	mikro-RNA lyhyt RNA, joka on yhteydessä geenien säätelyyn.
mRNA	viesti-ribonukleiinihappo
n_0 tai N_0	populaation koko kasvatuksen alussa
N-pää	N-pää on haarautumattoman aminohappoketjumolekyylin se pää, jossa on aminohappoon sitoutumaton vapaa aminoryhmä (-NH ₂). Tästä proteiinin katsotaan alkavan.
OD ₆₀₀	voidaan kirjoittaa myös O.D. 600, o.d. 600, OD600. optinen tiheys aallonpituudella 600 nm. optical density.
p-arvo	tilastollisessa hypoteesin testauksessa todennäköisyys, jolla vähintäänkin yhtä merkittävä ero tuloksessa saadaan aikaan käyttämällä nollahypoteesia.
PCR	polymeraasiketjureaktio
PD	Parkinsonin tauti
pDONR221	plasmidi, jota käytetään geenien vektorina
PGRN	progranuliinin prekursoriproteiini
poly-Q	laajentunut cytosiini-adeniini-guaaniini CAG-toistojaksojen alue genomissa N-terminaalinen polyglutamaatti
pre-mRNA	mRNA:n esiaste

prioni	infektoiva proteiini partikkeli
qPCR	kvantitatiivinen eli transkriptioiden määrää mittaava polymeraasiketjureaktio
r	populaatio kasvunopeus, jonka se voi saavuttaa, ellei kasvulle ole asetettu rajoituksia.
Raf	raffinoosi on oligosakkarideihin kuuluva orgaaninen yhdiste
rDNA	ribosomaalinen DNA
RGG-domeeni	RNA:ta sitova domeeni
ROS	reaktiiviset happiradikaalit
RPM	kierrosta minuutissa
SGD	hiivan genomitietokanta
<i>Sir2</i>	<i>sirtuiini 2</i> on geeni, joka on hiljaisen tiedon säätelijä 2 (engl. silent information regulator2)
siRNA	pieni häiritsevä RNA. Tämä säätelee mRNA:n toimintaa.
ssA β 1-42	yksijuosteinen amyloidi beta amylaasi, joka 42 aminohapon pituinen
TAR	trans-activation response element, suom. transaktivaation vaste-elementti
<i>TARDBP</i>	TAR-DNA:han sitoutuvaa proteiinia koodaava geeni.
TAR-DNA	TAR-DNA:a, johon TAR-DNA:han sitoutuva proteiini sitoutuu
TDP-43	TAR-DNA:han sitoutuva proteiini, joka on 43 kda:n kokoinen
TDP-43-YFP	TAR-DNA:han sitoutuva proteiini, joka on 43 kda:n kokoinen ja hiivan fluoresoiva proteiini
t_gen	kasvatuksen nopein mahdollinen generaatioaika, jota kutsutaan myös tuplaantumisajaksi. Tämä on lyhin aika, jossa solumäärä kaksinkertaistuu kasvatuksessa. Tämä kuvaa solun elinvoimaisuutta.
<i>TLS</i>	geeni, joka on siirtynyt translokaatiossa liposarkoomassa. Synonyymi <i>FUS</i> -geenille
t_mid	aika, jolloin populaatio on kasvanut puoleen teoreettisesta maksimiarvosta $\frac{1}{2}$ K.

trp	tryptofaani aminohappo
ura	urasidi nukleotidi
VCP	valosiinia sisältävä proteiini
vrk	vuorokausi
YPD	hiivan kasvualusta

1 JOHDANTO

Ikääntymiseen liittyvien ilmiöiden, kuten rappeutumisen ja sairauksien, tutkiminen on ensiarvoisen tärkeää, koska näistä on huomattavaa haittaa niin yksilölle kuin koko yhteiskunnalle (Kennedy 2014, Turkki 2013). Erityisen kiinnostavaa on, jos sairauksia ja rappeutumista pystyttäisiin parantamaan tai niiden haitallisia vaikutuksia voitaisiin vähentää (Kennedy 2014, Turkki 2013).

Ihmisten elinikä on pidentynyt maailmanlaajuisesti, ja sen seurauksena myös ikääntyneiden ihmisten määrä ja myös ikääntymiseen yhdistettävien sairauksien määrä on noussut (Kennedy 2014, Turkki 2013).

Ikääntymiseen voidaan yhdistää monia sairauksia, kuten hermostorappeumasairaudet, syöpä ja diabetes. Hermostorappeumasairauksissa on tunnusomaista proteiiniaggregaattien muodostuminen (Morimoto 2008).

Malliorganismit ja geenimuunnellut solumallit, kuten indusoidut pluripotentit kantasolut (IPSC), hiiva, hiiri, rotta, apina ja banaanikärpänen ovat tärkeitä lääketutkimuksessa, koska niillä pystytään tutkimaan potentiaalisten lääkemolekyylien vaikutusta vahingoittamatta ihmistä (Allen ym. 2008, Breyer ym. 2015, Outeiro & Giorgini 2006).

Hermotorappeumasairauden tilan matkimiseksi voidaan käyttää erityyppisiä solumalleja, kuten potilailta eristettyjä IPS-hermosolulinjoja mallinnettaessa sairauksia kuten Parkinsonin tauti (PD, Parkinson disease) ja Alzheimerin tauti (AD, Alzheimerin disease) (Byers ym. 2012, Israel ym. 2012).

SBC003-yhdiste on luonnonyrtistä eristetty molekyyli, jolla on havaittu olevan hermostorappeuma sairausmalleissa Parkinsonin tautiin, Alzheimerin tautiin ja Creutzfeldt–Jakobin tautiin konsentraatiosta riippuvainen haitallisilta proteiiniaggregaateilta suojaava vaikutus (SunRegen Healthcare AG, julkaisematon tulos).

Hiivasta on tullut mielenkiintoinen malliorganismi ikääntymisen ja ikääntymiseen liittyvien sairauksien tutkimuksessa. Monet prosessit ja aineenvaihduntareitit, jotka voidaan yhdistää ikääntymiseen ja myös moniin hermostorappeumasairauksiin, ovat hyvin samankaltaisia hiivalla ja ihmisellä (Khurana & Lindquist 2010). Malliorganismit auttavat ymmärtämään geenien vaikutuksen tietyn mekanismin taustalla (Aitman ym. 2011, Khurana & Lindquist 2010). Suurin osa hiivan geeneistä on hyvin samankaltaisia vastaavien ihmisen geenien kanssa (Khurana & Lindquist 2010). Lisäksi hiivan geneettiset muutokset on helppo jäljittää ja sen genomi on hyvin vakaa sekä sillä on lyhyt tuplaantumisaika (Khurana & Lindquist 2010).

Hiivalla pystytään tutkimaan tuntemattomien potentiaalisten lääkeyhdisteiden vaikutuksia soluun (Outeiro & Giorgini 2006). Hiivalla

tehdyt sairauksien mekanismitutkimusten tulokset ovat vertailukelpoisia ihmisten sairauksiin liittyvien tutkimusten kanssa, ja niistä saatava tieto on oleellista sairauksien mekanismien ja lääkkeiden vaikutusmekanismien selvittämisessä (Outeiro & Giorgini 2006).

1.1 Proteiinien laskostuminen soluissa ja hermostorappeumasairaudet

Proteiinien laskostumisen ja rakenteen täytyy olla elimistössä hyvin joustavaa, jotta ne pystyvät täyttämään biologisen tehtävänsä (Hartl ym. 2011). Proteiinit eivät ole luonnollisessa ympäristössään termodynaamisesti kovin vakaita molekyylejä, ja proteiinien laskostumiseen vaikuttavat aminohapposekvenssin lisäksi myös ympäröivät olosuhteet (Anfinsen 1973, Hartl ym. 2011). Suurin osa proteiineista laskostuu oikein niiden toiminnalliseen muotoonsa. Epävakaasta luonteesta johtuen proteiinit voivat muuttua ympäristön vaikutuksesta vaarallisiksi muodoiksi (Hartl ym. 2011).

Proteiinisynteesi on virhealtis tapahtuma, jolloin virheellisiä proteiineja saattaa muodostua myös tässä vaiheessa (Drummond ym. 2009).

Proteiinien muuttumiseen haitallisiksi muodoiksi vaikuttavat myös mutaatiot geneissa ja geenien säätelymekanismeissa, jolloin mutaatiot voivat ilmentyä virheellisesti laskostuneina proteiineina (Takalo ym. 2013).

Solussa on proteiinien laskostumiselle laadunvarmistusjärjestelmä, joka koostuu monen proteiinin muodostamasta verkostosta. Normaaliolosuhteissa ne yleensä estävät virheellisesti laskostuneiden proteiinien syntymisen (Morimoto 2008). Laadunvarmistusjärjestelmään kuuluu saperonien (engl. chaperons) muodostama verkko, ubikitiini-proteasomeja ja autofagosytoosijärjestelmä (Hartl ym. 2011, Morimoto 2008, Glickman ym. 2002).

Lämpöshokki-transkriptiotekijöitä koodaava geeni (*HSF1*, Heat shock factor 1) tuottaa HSF1-transkriptiotekijöitä.

Stressittömässä tilassa yksittäiset HSF1:t ovat sitoutuneita HSP70 / HSP90. Ympäristön stressitekijät aiheuttavat reaktion, jonka seurauksena HSF irtautuu HSP70/HSP90 ja trimerisoituu. Trimerisoitunut HSF1 säätelee *HS*-geenien transkription kautta vastetta erilaisiin stressitekijöihin tuottamalla lämpöshokkiproteiineja (HSP) (Morimoto 2008, Mesika & Reichmann 2019).

Tämän tyyppisiä solujen stressitiloja voivat aiheuttaa esimerkiksi ympäristötekijät, sairauden seuraukset, normaalit solun kasvuun ja kehitykseen liittyvät tapahtumat ja sairaudet, joissa muodostuu virheellisesti laskostuneita proteiineja kuten hermostorappeuma sairaudet. Nämä tekijät voivat myös vaikuttaa ristiin, ja jotkut voivat olla seurausta toisistaan (Morimoto 2008, Morimoto & Nollen 2003).

Monet HSP:t auttavat proteiinia laskostumaan oikein (Morimoto 2008).

Mikäli virheellisesti laskostuneita proteiineja on paljon, voi proteiinien laadunvarmistusjärjestelmä ylikuormittua ja häiriintyä. Tällöin virheellisesti laskostuneita proteiineja voi kasautua soluun, mikä häiritsee solun sisäistä tasapainoa ja saattaa aiheuttaa taudin (Morimoto 2008).

Proteiinien virheellisestä laskostumisesta on havaittu aiheutuvan kahden tyyppisiä haitallisia vaikutuksia: 1. proteiini ei pysty täyttämään sen biologista tehtäväänsä ja 2. virheellisesti laskostunut proteiini voi olla myös haitallinen ympäristölleen (Jucker & Walker 2013). Proteiinien haitallisuuden katsotaan olevan seurausta viallisten proteiinien muodostamista oligomeereistä, kuitujen esiasteista, kuiduista ja proteiiniaggregaateista (Tenreiro 2013).

Proteiinin väärin laskostumisesta voi aiheutua haitallisia seurauksia, jotka vaikuttavat solun ja koko organismin elinkykyyn. Tämän tyyppisiä sairauksia ovat esimerkiksi Alzheimerin tauti, Parkinsonin tauti, Huntingtonin tauti ja etuaivolohkon dementia (FTDL, Frontal Lobe Dementia) (Tenreiro 2013, Reline ym. 2014).

Vaarallinen muutos proteiinin rakenteessa tapahtuu, kun α -kierre muuttuu β -laskokseksi (Reynaud ym. 2010). Tutkimuksissa on havaittu, että viallisesti laskostuneet proteiinit voivat muodostaa spontaanisti itsensä ja muiden proteiinien kanssa haitallisia vuorovaikutussuhteita. Virheellisesti laskostuneista amyloidiaggregaateista seuraa ihmiselle joissain tapauksissa sairauden oireita (Jucker & Walker 2013).

On havaittu, että monet hermostorappeumasairaudet voivat levitä aivoissa prionisairauksien tapaan (Lee ym. 2011). Hermostorappeuma sairaudet eivät leviä yksilöltä toiselle ja poikkeavat tässä suhteessa prionisairauksista (Aguzzi & Lakkaraju 2016).

Jokaisella hermostorappeumasairaudella on niille luonteenomainen proteiiniaggregaatti ja ne esiintyvät niille ominaisissa hermosoluissa sekä niille tyypillisillä aivojen osa-alueilla (Lee ym. 2011).

Proteiiniaggregaattien syntyminen voi tapahtua esimerkiksi joissakin aivojen solupopulaatioissa. Virheellinen proteiinien laskostuminen kopioituu suoraan toisiin proteiineihin, jolloin tauti leviää hermostossa (Peggion ym. 2014, Aguzzi & Lakkaraju 2016). On olemassa myös viitteitä siitä, että muutokset jotka aiheuttavat proteiinien kehittyminen haitalliseksi ja niiden leviäminen toisiin soluihin ovat erillisiä tapahtumia (Aguzzi & Lakkaraju 2016, Peggion ym. 2014). Amyloidi ja prionisairaudet voivat olla periytyviä tai esiintyä sporadisesti (Krammer ym. 2009).

Vaikka monet hermostorappeumataudit ovat perinnöllisiä, taudin ilmenemiseen vaikuttavat sekä solun sisäiset ja ulkoiset olosuhteet että geenien epigeneettinen säätely (Moskalev & Vaiserman 2017, Hartl ym. 2011). On havaittu, että näiden sairauksien suurin riskitekijä on ikääntyminen (Hartl ym. 2011). Tämän on arveltu johtuvan muun maassa siitä, että proteiinien laadunvarmistusjärjestelmä heikkenee, joka voi johtaa proteiinien väärin laskostumiseen ja proteiiniaggregaattien muodostumiseen (Hartl ym.

2011).

Myös DNA:n mutaatiot lisääntyvät ja kumuloituvat ikääntymisen myötä (Maynard ym. 2015). Erilaisten DNA:n mutaatioiden seurauksena voi syntyä normaalia enemmän väärin laskostuneita proteiineja, joka vaikuttaa proteiini tasapainoon (Xie & Jarosz 2018, Maynard ym. 2015).

Lisäksi vaikutusta on myös proteiinin laskostumisella, kokoamisella, purkamisella, puhdistusmekanismeilla, RNA:n prosessoinnilla ja metabolialla (Balch ym. 2008, Morimoto 2008).

Varmuudella ei kuitenkaan tiedetä miten ikääntyminen vaikuttaa proteiiniaggregattien muodostumiseen (Di Gregorio & Duennwald 2018).

Pienemmät oligomeerit ovat haitallisempia kuin isommat proteiinikappaleet. Isompien kappaleiden muodostumisella näyttäisi olevan suojaava vaikutus (Di Gregorio & Duennwald 2018).

Tutkimuksissa on havaittu, että tietyt elintavat edesauttavat Parkinsonin- ja Alzheimerin taudin kehittymistä ja etenemistä (Kivipelto ym. 2018). Tämän tyyppisiä sairautta edistäviä elintapoja ovat esimerkiksi vähäinen liikunta, epäterveellinen ravinto ja matala koulutustaso (Kivipelto ym. 2018). Tällä hetkellä ei ole olemassa hoitokeinoja, jolla olisi todellisia hermostorappeumaa hidastavia vaikutuksia (Polymenidou & Cleveland 2012).

1.2 Hiiva malliorganismina

Leivinhiiva on ollut tärkeässä roolissa tutkittaessa nisäkässolujen biokemiaa ja molekyylibiologiaa (Botstein & Fink 2011).

Leivinhiiva on erinomainen tutkimuksen malliorganismi monesta syystä. Sillä on lyhyt elinkaari ja siihen on helppo soveltaa eri molekyylibiologisia menetelmiä (Khurana & Lindquist 2010). Sen kasvattaminen on helppoa, solujen tuplaantumisaika on lyhyt, sitä on helppo geneettisesti manipuloida, se kestää hyvin liuottimia ja sen kasvatuskustannukset ovat suhteellisen pienet.

Monilla muilla organismeilla tutkimukseen käytetty aika menisi kohtuuttoman pitkäksi. Ikääntymisen tutkimisessa lyhyt elinkaari on erityisen tärkeä asia (Khurana & Lindquist 2010).

Leivinhiivaa on käytetty jo pitkään hyödyksi monissa eri tutkimussovellutuksissa, ja sen molekyylibiologia tunnetaan erinomaisesti. Hiivan genomi on sekvensoitu jo vuonna 1996 (Goffeau ym. 1996).

Leivinhiivalla on myös oma tietokanta (Saccharomyces Genome Database (SGD) (<http://www.yeastgenome.org>)), jonne on koottu tietoa hiivan genomista, geenien tuotteista ja kromosomistosta sekä niiden vuorovaikutuksesta toisiinsa. Hiivan geenien biologisesta roolista vähintään 80 prosenttia on tunnettu, mikä tekee hiivasta parhaiten tunnetun eukaryoottisolun (Khurana & Lindquist 2010).

Yli neljäsosalla positionaalisesti hiivasoluun kloonatuista ihmisen sairausgeeneistä on läheinen ortologi hiivan geenien kanssa (Khurana & Lindquist 2010). Monet prosessit ja aineenvaihduntareitit, jotka voidaan yhdistää myös moniin hermostorappeumasairauksiin, ovat hyvin samankaltaiset hiivalla ja ihmisellä (Khurana & Lindquist 2010). Tämän tyyppisiä konservoituneita solun prosesseja ovat solun jakautuminen, transkriptio säätely, proteiinien laskostuminen, proteiinien laadunvarmistusjärjestelmät, kalvorakkulaliikenne, solujen kyky kierrättää omia soluelimiä ja rakenteita, lipidiaineenvaihdunta, ikääntyminen, solun kuolema sekä mitokondrioiden aineenvaihdunta ja biogeneesi (Khurana & Lindquist 2010).

Vaikka ihmisen ja hiivan DNA-sekvenssit ovat muuttuneet evoluution aikana, monet niiden tuottamien proteiinien biologisista tehtävistä ovat pysyneet samana (Khurana & Lindquist 2010).

Yli puolet hiivan geeneistä pystytään korvaamaan ihmisen ortologeilla niiden tuottamien proteiinien toiminnan kuitenkin muuttumatta. Myös tämä todistaa, että hiiva toimii hyvin malliorganismina tutkittaessa näiden proteiinien biologisia prosesseja (Kachroo ym. 2015).

Käytettäessä hiivaa tutkimuksen apuvälineenä pystytään luomaan suora linkki geenien ja kemiallisten yhdisteiden välille (Outeiro & Giorgini 2006, Santos ym. 2012).

Hiivasta on tehty myös genomisia DNA-kirjastoja, joissa systemaattisesti geenejä deletoidaan tai yliekspressoitetaan. Tämän avulla pystytään löytämään uusia geenien vuorovaikutussuhteita ja lääkemolekyylien vaikutuskohteita (Outeiro & Giorgini 2006).

Nämä edellä mainitut seikat tekevät hiivasta kiinnostavan malliorganismin myös hermostorappeumasairauksien lääketutkimuksessa, kun tutkitaan lääkkeen vaikutusmekanismeja soluihin (Outeiro & Giorgini 2006, Santos ym. 2012).

Tutkimusta tehtäessä hiivasoluja ja nisäkässoluja ei voida suoraan verrata keskenään vaan tulee ottaa huomioon niiden erilaisuudet (Outeiro & Giorgini 2006).

Hiiva ja nisäkässolut poikkeavat osittain toisistaan geneettisesti ja epigeneettisesti. Hiivalla tehtyjä tutkimuksia on käytetty pohjana ja apuna nisäkkäillä tehtävään tutkimukseen ja niiden avulla löydettiin monia tärkeitä mekanismeja nisäkkäillä (Fuchs & Quasem 2014).

Geenien ilmenemisen määrän tutkiminen tuo tärkeää tietoa lääkeaineiden vaikutuksesta (Lobo 2008). Hiivan ja muiden organismien solujen geenien ilmenemistä pystytään tutkimaan hyvin tarkasti ddPCR-menetelmällä (digitaalinen pisara PCR) (Sanders ym. 2013).

Hiivan epigeneettisestä säätelystä puuttuu kuitenkin osa mekanismeista mitä korkeammilla eukaryooteilla on kuten DNA:n metylaatio, histonien metylaatio ja siRNA (pieni häiritsevä RNA, Small interfering RNA) (Fuchs & Quasem 2014). Hiivasolut eivät erilaistu erityiseen tehtävään ja ne eivät

myöskään ole monisoluisia eivätkä muodosta elimiä (Outeiro & Giorgini 2006).

Hiivalla on tärkeä rooli lääkkeiden alustavien ja täydentävien tutkimuksien tekemisessä, ja tarkemmat tutkimukset tehdään fysiologisesti oleellisimmilla organismeilla (Outeiro & Giorgini 2006).

1.2.1 Hermostorappeumasairaudet ja hiiva hermostorappeumasairauksien malliorganismina

Osa hiivan proteiinien tehtävistä on muuttunut evoluution aikana. Kun tiedetään, että proteiinin tehtävä on muuttunut, osataan myös arvioida miten muutos vaikuttaa hiivasolun mekanismeihin ja tämä pystytään ottamaan huomioon sairautta tutkittaessa.

Hiivalla on kyky muokata proteiiniaggregaattien haitallisuutta, johon vaikuttaa geenien tehostajien (enhancer) toiminta (Outeiro & Giorgini 2006).

Tutkimuksissa hiivan genomista on löydetty 52 sekvenssin deletiota (pistemutaatio), jotka muuttavat Huntinktonin-aggregaatin (Htt, Huntinkton) haitallisuutta (Outeiro & Giorgini 2006). *Htt*-geenin tehostajista 35-prosenttia on yhteydessä proteiinien laskostumiseen ja solustressiin. Lisäksi on löydetty myös 86 sekvenssin deletiota, jotka muuttavat α -synukleiinien haitallisuutta. *α -synukleiinin* tehostajista 32-prosenttia on yhteydessä vesikkelien kuljetukseen ja lipidiaineenvaihduntaan (Outeiro & Giorgini 2006). On havaittu, että geenien tehostajat, jotka moduloivat α -synukleiinin ja Htt-kappaleiden haitallisuutta, ovat varsin erilaisia (Outeiro & Giorgini 2006).

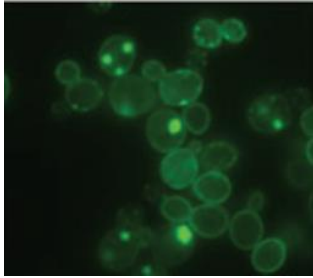
Puolet tutkimuksissa eristetyistä geeneistä ovat ihmisten geenien kanssa ortologisia, ja tämä saattaa merkitä sitä, että ihmiselläkin on konservoitunut biologinen vaste α -synukleiinin ja Htt-kappaleiden haitallisille vaikutuksille (Outeiro & Giorgini 2006).

Solujen prionityyppisten (Prioni, infektoiva proteiini partikkeli) partikkelien muodostumismekanismien on arveltu olevan konservoitunut bakteerista hiivaan ja aina ihmiseen asti (Outeiro & Giorgini 2006).

Monilla eri menetelmillä pyritään matkimaan taudin vaikutuksia soluun. Kun tiedetään, että hiivalla on selvä homologi ihmisen sairausgeenin kanssa, voidaan mutatoida geeni ja aiheuttaa sen toiminnan muuttuminen tai toimintakyvyn menetys. Mikäli selvää homologiaa ei ole, pystytään sairauteen yhdistetty geeni insertoimaan genomiin ja ilmentämään tätä. Jälkimmäistä menetelmää käytetään usein tutkittaessa hiivalla hermostorappeumasairauksia (Khurana & Lindquist 2010).

1.2.1.1 Parkinsonin tauti ja hiiva α -synukleiini sairausmalli

Parkinsonin tautia sairastavilla potilailla esiintyy normaalista poikkeavia proteiinikertymiä, joita kutsutaan Lewyn kappaleiksi. Lewyn kappaleet koostuvat pääosin proteiinista, jota kutsutaan α -synukleiiniksi. *SNCA*-geeni koodaa α -synukleiinia. Lewyn kappale pitää sisällään myös 76 muutakin proteiinimolekyyliä (Beyer ym. 2009).



Kuva 1. Hiiva α -synukleiinisairausmalli. α -synukleiinisairausmallin hiivasoluja, joiden α -synukleiinin muodostuminen on indusoitu galaktoosilla. α -synukleiinin lisäksi genomiin on lisätty *GFP* (vihreä fluoresoiva proteiini) koodaava geeni, jolloin soluihin muodostuvat proteiiniaggregaatit näkyvät kuvassa fluoresoivina vihreinä pisteinä. (Kuva Tenreiro ym. 2013. Tekijänoikeus saatu käyttäen kuvaa julkaisijan luvalla).

Lewyn kappaleiden muodostumisen syynä pidetään α -synukleiinin oligomerisaatiota ja proteiiniaggregaattien muodostumista (ks. kuva 1). α -synukleiinin molekulaarista toimintamekanismia Lewyn kappaleiden muodostumisessa ei täysin tunneta (Burré 2015).

α -synukleiinin molekulaarista toimintamekanismia ei tunneta täysin, mutta sen toiminta on yhdistetty oppimiseen, kehittymiseen ja aivojen plastisuuteen ja on hyvin todennäköisesti yhteydessä synapsien vesikkelien kierrätykseen (Outeiro & Giorgini 2006).

α -synukleiini on pieni lipideihin sitoutuva proteiini, joka vaikuttaa solujen Ca^{2+} -tasapainoon. Solun toiminnan kannalta on tärkeää, että se pystyy hallitsemaan Ca^{2+} -tasapainoa. Ca^{2+} -tasapainon menetys aiheuttaa solulle haitallisen tilan (Caraveo ym. 2014).

α -synukleiinin väärin laskostuminen ja kertyminen kappaleiksi on tunnusomaista monissa hermostorappeumasairauksissa. Tällöin α -synukleiini ei pysty täyttämään sen biologista tehtävää kalsiumtasapainon ylläpitäjänä solussa (Caraveo ym. 2014). Lisäksi sillä on haitallisia vaikutuksia vesikkeleihin ja mitokondrioiden toimintaan, ja se voi aiheuttaa nitrosatiivista stressiä (reaktiivisten typpiyhdisteiden aiheuttama stressi) ja lopuksi solun kuoleman. Nämä vaikutukset ovat hyvin samankaltaisia niin ihmisen kuin hiivan soluissa (Caraveo ym. 2014).

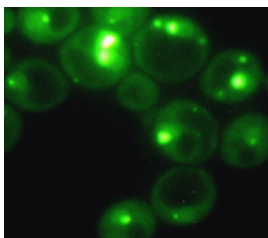
Kun indusoidaan ihmisen väärin laskostuneen α -synukleinin muodostumista hiivasoluissa, aiheuttaa se samankaltaisia patogeenisiä tiloja kuin se aiheuttaa ihmisen hermosoluissa (Caraveo ym. 2014).

α -synukleiinilla on voimakas taipumus kiinnittyä fosfolipideihin ja siksi sitä löytyy solukalvoista. α -synukleinia löytyy hermosolujen synapsien vesikkeleistä. Hiivalla on jatkuva vesikkelien kuljetus, jonka vuoksi hiiva malleista α -synukleinia löytyy vesikkeleistä solunpinnasta (ks. kuva 1) (Khurana & Lindquist 2010).

1.2.1.2 Alzheimerin tauti ja hiiva β -amylaasisairausmalli

Alzheimerin tauti on maailmanlaajuisesti yleisin hermostorappeumasairaus ja sen tunnusomainen merkki on β -amylaasipeptidien aggregaattien muodostus. β -amylaasipeptidi muodostuu, kun sen esiaste proteiini (APP) katkeaa proteolyttisesti useamman kerran peräkkäin (Selkoe ym. 2007).

γ -sekretaasi on entsyymi, joka esiintyy normaalioloissa soluissa ja sen tehtävänä on prosessoida solun kalvoproteiineja. γ -sekretaasin poikkeava muoto on yhteydessä β -amylaasin muodostumiseen, ja tämä on toinen mekanismi, joka aiheuttaa haitallisten proteiiniaggregaattien muodostumista (Selkoe ym. 2007).



Kuva 2. Hiiva β -amylaasisairausmalli. Kuvassa β -amylaasisairausmallin hiivasoluja, joiden tautia aiheuttava geeni ja *GFP*-geeni on indusoitu galaktoosilla, jolloin fluoresoivat haitalliset proteiiniaggregaatit tulevat esille. (Kuva Bharadwaj ym. 2010. Tekijänoikeus saatu käyttää kuvaa julkaisijan luvalla).

β -amylaasipeptidin muodostumisen ja hajoamisen välisen epätasapainon on arvioitu olevan syynä haitallisen β -amylaasioligomeerien ja solun ulkoisen β -amylaasiplakin muodostumiseen.

Toimintakyvyttömän proteiinin aiheuttamia haittavaikutuksia ei ymmärretä vielä täysin mutta amyloidin β -laskosmuoto on kuitenkin yhdistetty proteiinin haitallisuuteen, samoin kuin itse amyloidin muodostusprosessi ja siinä muodostuneet välituoteproteiinit (Jucker & Walker 2013). Oligomeerien on todettu olevan näistä partikkeleista kaikkein haitallisimmat (Knobloch 2007).

Alzheimerin taudissa proteiinit muodostavat amyloidiaggregaatteja, joiden

syntyminen on konservoitunut bakteerista hiivaan, ja aina ihmiseen asti (Ramón ym. 2014).

Virheellisesti laskostuneet tau-säikeet ovat merkki Alzheimerin taudista ja niitä esiintyy myös monessa muussa hermostorappeumasairaudessa (Lee ym. 2001). Nämä plakit pystyvät liikkumaan solukalvojen läpi ja ne pääsevät liikkumaan hermosolujen eri osiin (Treusch ym. 2011). Tämän aiheuttaman patogeenisen tilan matkiminen on ollut vaikeaa hiivasairausmalleilla. Hiivan A β -mallilla on pystytty kuitenkin havaitsemaan toiminnallinen yhteys β -amylaasin haitallisuuden, endosytoottisen liikenteen ja Alzheimerin taudin välillä, jonka vuoksi hiivasolumallia pystytään käyttämään apuna myös taudin tutkimisessa (Treusch ym. 2011).

Hiivasoluissa pystytään havaitsemaan nopeasti ja edullisesti amyloidiaggregaattien aiheuttamat haitalliset vaikutukset (ks. kuva 2). Tätä voidaan hyödyntää geneettisissä tutkimuksissa ja lääketutkimuksissa paremmin kuin muissa malliorganismeissa (Outeiro & Giorgini 2006).

1.2.1.3 ALS- ja FTDL-sairaudet sekä hiiva TDP-43-sairausmalli

TDP-43 on TAR (transaktivaatio vaste elementti) –DNA sitoutuva proteiini 43), joka on 43 kDa:n kokoinen. *TARDBP*-geeni koodaa TDP-43-proteiinia. Tätä proteiinia on terveessä solussa enimmäkseen tumassa, mutta sillä on rooli myös RNA-granuloiden säätelijänä (Johnson ym. 2008). TDP-43 säätelee pre-mRNA:n silmukoinnin avulla monia geenejä kuten *CFTR* (koodaa solukalvon kloridikanavan proteiinia), *TARDBP*, *FUS*, *SNCA*, *HTT* ja *APP* (Prasad ym. 2019).

TDP-43 vaikuttaa transkription repressioihin ja translaation säätelyyn, ja sillä on rooli mRNA:n kuljetuksessa, ja se säätelee myös mRNA:n vakautta (Prasad ym. 2019). Lisäksi se on mukana prosessoimassa miRNA:ta ja lncRNA:ta (pitkä ei koodaava RNA) (Prasad ym. 2019).

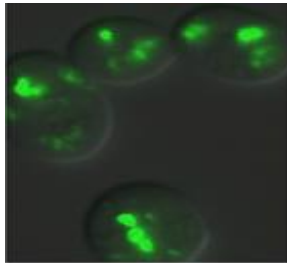
TDP-43 löytyy sytoplasmasta haitallisista proteiiniaggregaateista, joita on löydetty joidenkin ALS (amyotrofinen lateraaliskleroosi sairaus) ja etuaivolohkon dementian muotoja sairastavien potilaiden hermosoluista (Forman ym. 2007).

FUS (proteiini joka on fuusioitunut sarkoomassa, Fused in Sarkoma) - ja TDP-43 löytyvät erilaisista proteiiniaggregaateista tietyistä etuaivolohkondementian ja ALS-sairauden muotoja sairastavilta potilailta, mutta sairauksia aiheuttavat mekanismit ovat sairauksien välillä hieman erilaiset (Trojanowski ym. 2007).

Vielä ei ole varmuutta aiheuttaako itse TDP-43-proteiini sairautta (Johnson ym. 2008).

Yli 40-prosentilla FTDL:n tautia sairastavien potilaiden proteiiniaggregaateista löytyy FTLD-U (ubikitonikappaleita) ja tämä

sairauden tyyppi on yhdistetty kolmeen perinnölliseen geneettiseen poikkeamaan. I Mutaatio *PGRN* -geenissä (Progranulini proteiinia koodava). Tämä geeni sijaitsee genomissa 17q21 ja on 1,7 Mb (miljoonaa emäsparia) kokoinen. Kaikkien tässä geenissä tapahtuvien mutaatioiden arvioidaan aiheuttavan mRNA:n ennen aikaista hajoamista (Cruts ym. 2006). II VCP (valosiinia sisältävään proteiini) on yhdistetty solun toimintoihin: solusyklin kontrolloimiseen, solumembraanien yhdistymiseen ja ubigitiini-proteasomien hajottamiseen. Perinnöllisen dominantin sairauden tila IBMPFD (engl. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, tietty etuaivolohkon demensian muoto) on yhdistetty mutaatioihin 9p21.1-p12-alueella (Watts ym. 2004). III Lisäksi sairaus on yhdistetty kromosomin 9p21.3-p13.3 uuteen ALS-FTD-lokukseen (Morita ym. 2006).



Kuva 3. Hiiva TDP-43-sairausmalli. Kuvassa hiivasoluja, joissa ihmisen *TDP43* jossa GFP-proteiinin ekspressio on indusoitu galaktoosilla, jolloin fluoresoivat proteiiniaggregaatit tulevat esiin. (Kuva Couthouisa ym. 2011. Tekijänoikeus saatu käyttää kuvaa julkaisijan luvalla).

Hiiva sairausmallissa käytettiin plasmidia, jossa on korkea kopiokopiomäärä *TDP-43*:n FTLD-U-altyyppejä, johon on lisätty GFP-merkkigeeni.

Testattaessa hiivakantaa havaittiin *TDP-43*:n GFP:llä merkittyjä proteiiniaggregaatteja sytoplasmassa (ks. kuva 3), ja spottitesteissä havaittiin, että solujen kasvu oli merkittävästi huonompaa. Tästä voidaan päätellä, että *TDP-43*-geeni vaikuttaa solun elinvoimaisuuteen ja tämän vuoksi hiivan *TDP-43*-sairausmalli toimii hyvin apuna tutkittaessa FTDL- ja ALS -sairauksia (Johnson ym. 2008).

1.2.1.4 ALS- ja FTDL-sairaudet sekä hiiva FUS-sairausmalli

FUS-geenin ilmentyessä muodostuu FUS-proteiinia, jolla on monenlaisia tehtäviä soluissa. Sen N-terminaalinen pää toimii transkriptiotekijänä, joka vaikuttaa transkription käynnistämiseen, mRNA:n kuljettamiseen ulos tumasta ja RNA:n silmukointiin (Vance ym. 2009). *FUS*:n C-terminaalinen pää pystyy sitoutumaan yksijuosteiseen DNA:han ja RNA:han. *FUS*-geenillä

ja edelleen sen koodaamalla FUS-proteiinilla on todettu olevan yhteys DNA:n korjausmekanismeihin ja sitä kautta genomien vakauteen (Wang ym. 2013). TDP-43 ja FUS:n on arveltu olevan yhteydessä neuronien plastisuuteen (Lagier-Tourenne & Cleveland, 2009).

FUS-geeni ja sen koodaama FUS-proteiini ovat yhteydessä ikääntymiseen ja ne vaikuttavat monien ikääntymiseen liittyvien sairauksien syntyyn (Uzhachenko ym. 2017).

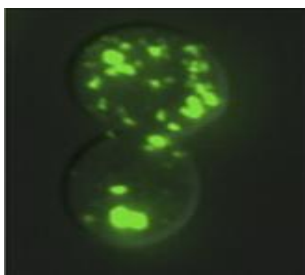
Useiden eri tehtäviensä vuoksi myös useat eri mutaatiot *FUS*-geenissä aiheuttavat monen tyyppisiä sairauksia, ja ALS:n sekä FTDL:n lisäksi sitä löytyy myös useista eri syöpämuodosta, joissa mutaatio on löydetty vain syöpäkasvaimesta (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FUS#sourcesforpage>, luettu 15.1.2020).

Terveissä soluissa FUS-proteiinia löytyy yleensä tumasta, mutta se pystyy liikkumaan myös tuman ja sytoplasman välillä. Sairaissa soluissa sitä löytyy erityisesti sytoplasmastasta (Wang ym. 2013).

Mutaatio *FUS*-geenin tuman kohdennussekvenssissä aiheuttaa häiriön DNA:n korjausmekanismeihin, mikä johtaa FUS-proteiiniaggregaattien muodostumiseen ja hermostorappeumasairauden kehittymiseen.

FUS-proteiini on keskeinen tekijä hermo- ja gliasolujen DNA:n korjausmekanismeissa ja siksi hermosolut ovat alttiita virheellisesti laskostuneen FUS-proteiinien haitallisille vaikutuksille (Wang ym. 2013).

Amyotrofinen lateraaliskleroosi eli ALS on vakava hermostorappeumasairaus. Sairaus on nopeasti etenevä ja johtaa halvaantumiseen ja kuolemaan keskimäärin kolmen vuoden sisällä sairauden toteamisesta (Vance ym. 2009). Sairauteen ei ole tehokasta hoitokeinoja. FUS-proteiiniaggregaatin muodostumista pidetään merkinä ALS-sairaudesta. FUS-proteiinia on löydetty myös etuaivolohkon dementiaassa esiintyvistä proteiinikappaleista (Sun ym. 2011).



Kuva 4. Hiiva *FUS*-sairausmalli. Kuvassa ylhäällä hiivasolu on jakautumassa. *FUS*-geeni johon on lisätty *GFP*-geeni on indusoitu galaktoosilla tuottamaan haitallisen proteiiniaggregaatin, jolloin fluoresoivat proteiiniaggregaatit näkyvät kuvassa vihreinä. Kuvassa näkyy myös kuinka haitalliset proteiiniaggregaatit siirtyvät tytärsolulle. (Kuva Couthouisa ym. 2011. Tekijänoikeus saatu käyttäen kuvaa julkaisijan luvalla)

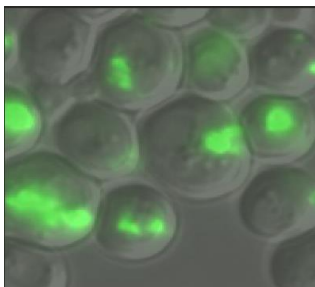
FUS-proteiini muodostaa proteiiniaggregaatin ja sitoutuu RNA:han, mikä aiheuttaa haitallisen ilmiön solussa. FUS-proteiinit muodostavat spontaanisti oligomeeri- ja säierakenteita hiivasoluissa ja ALS-potilaiden soluissa. Bioinformaattisilla algoritmeilla on löydetty prionityyppinen domeeni aminohapon N-päästä (Sun ym. 2011). FUS-proteiini aiheuttaa haitallisia vaikutuksia hiivasolussa (ks. kuva 4), samaan tapaan kuin ALS-potilaiden hermosoluissa (Sun ym. 2011).

FUS-proteiinin haitallisen proteiiniaggregaatin muodostumisen edellytys on, että proteiinissa on prionityyppinen ja RGG-domeeni (RNA:ta sitova domeeni) (Sun ym. 2011).

Hiivasta löytyy 24 geeniä, jotka vähentävät *FUS*-geenin koodaamien proteiinien haitallisuutta, ja kymmenen geeniä, jotka lisäävät niitä (Sun ym. 2011). Monia FUS-proteiinin haitallisia vaikutuksia moduloivista geeneistä, joita löytyy hiivan genomista, löytyy niille homologisia geenejä ihmisen genomista. Tämä yhtäläisyys tekee hiivasta mielenkiintoisen solumallin tutkittaessa *FUS*-geeniin yhdistettäviä sairauksia (Sun ym. 2011).

1.2.1.5 Huntingtonin tauti ja hiiva HTT-sairausmalli

Huntingtonin tauti on kohtalokas ja yleensä myöhäisellä iällä ilmenevä sairaus. Sairautta aiheuttaa CAG (cytosiini-adeniini-guaaniini) -toistojaksojen monistuminen *HTT*-geenissä, joka koodaa N-terminaalista poly-glutamaattia. Kun tämä jakso pitenee yli kriittisen pituuden, muodostuu tämän seurauksena epänormaali Huntingtonin proteiini (Htt), joka puolestaan aiheuttaa taudin patogonian (Mason ym. 2011, Duennwald ym. 2006).



Kuva 5. Hiivan Htt-sairausmalli. Kuvassa on hiivasoluja, joita on geneettisesti muokattu matkimaan ihmisen Huntingtonin tautia. Htt103Q-proteiiniaggregaatien ja GFP-proteiinin muodostus on indusoitu galaktoosilla, jolloin fluoresoivat proteiiniaggregaatit tulevat esiin (Kuva Hofer ym. 2018. Tekijänoikeus saatu käyttää kuvaa julkaisijan luvalla).

Huntingtonin proteiini aiheuttaa leviävän solujen toimintakyvyttömyyden. Solun mekanismeihin aiheutuvia erilaisia vaikutuksia ovat häiriöt transkription säätelyssä, solusykklissä, proteiinien laskostumisessa, rakkulaliikenteessä ja mitokondrioiden toiminnassa, josta seurauksena on

solujen apoptoosi.

Huntingtonin proteiinin on havaittu aiheuttavan samankaltaisia haitallisia vaikutuksia hiivasolussa kuin nisäkkäiden sairausmalleissa ja sairastuneen ihmisen soluissa. Tästä syystä HTT-hiivakanta (ks. kuva 5) toimii hyvänä apuvälineenä tutkittaessa Huntingtonin tautia (Mason ym. 2011, Duennwald ym. 2006).

1.3 Hiiva ikääntymisen malliorganismina

Ikääntymistutkimuksessa leivinihiiva on osoittautunut hyväksi malliorganismiksi. Hiivan kronologinen ikääntyminen on osoittautunut myös hyväksi ja vertailukelpoiseksi menetelmäksi tutkittaessa eri mekanismeja nisäkkäiden ja muiden korkeampien eukaryoottien post-mitoottisissa soluissa (Fabrizio & Longo 2007). Hiivan kronologisella ikääntymisellä on pystytty tutkimaan tärkeimpiä signaalintireittejä, jotka ovat yhteydessä solujen ikääntymisen säätelyyn myös korkeammilla eukaryooteilla (Fabrizio & Longo 2007). Tämä viittaa siihen, että pitkäikäisyys riippuu myös geenien ja signaalireittien aktiivisuudesta ja että samat signaalintireitit, jotka ovat vastuussa solujen ikääntymisestä, ovat konservoituneet ja jakavat keskenään yhteisen evolutiivisen alkuperän (Kaeberlein 2010).

Hiiva on tärkeimpiä malliorganismeja tutkittaessa ikääntymistä. Ikääntymisen seurauksena organismin elinkyky heikkenee.

Hiivasoluissa on havaittu, että stressittömässä tilassa ne kapseloivat viallisia proteiineja ER (endoplasmakalvoston) pinnalle, mikä saattaa olla vaste solujen ikääntymiseen (Saarikangas & Caudron 2017). Näiden partikkelien esiintyvyys korreloi ikääntymisen kanssa. Partikkelien muodostuminen hyödyttää aluksi proteiinien laadun kontrollointijärjestelmää, mutta elinkaaren lopussa proteiiniaggregaattien kertyminen on yhteydessä solun elinvoimaisuuden vähenemiseen (Saarikangas & Barral 2015).

Tutkimuksissa on havaittu, että proteiiniaggregaattien muodostus on yhteydessä hiivan replikatiiviseen ikääntymiseen. Solun jakautuessa vialliset proteiinikertymät jäävät emosoluun, jolloin emosolu vanhenee ja tytär solu pääsee aloittamaan ilman viallisia proteiiniaggregaattikertymiä (Saarikangas & Barral 2015).

Suojausmekanismit heikkenevät hiivasolun ikääntyessä. Lisäksi proteiiniaggregaatteja syntyy enemmän, jolloin suojaavat mekanismit saattavat ylikuormittua. Normaalin ikääntymisen seurauksena proteiiniaggregaatit kertyvät soluihin, jolloin ne vaikuttavat solujen elinkykyyn (Saarikangas ym. 2015).

Soluun syntyy proteiinikertymiä myös erilaisten stressitilanteiden, kuten lämmön seurauksena. Proteiinikertymät voidaan purkaa stressin poistuttua. Solut varastoivat niitä endoplasmakalvoston pinnalle Q-kappaleiksi (Escusa-

Toret ym. 2013).

Prionityyppiset proteiinit pystyvät leviämään hiivassa emosolusta tytärsoluun ja postmitoottisissa hermosoluissa solusta toiseen (Jucker & Walker 2013).

1.3.1 Spottitestit

Spottitestit ovat yleisesti käytetty menetelmä kasvunopeuden seurannassa. Testissä mitataan aluksi OD₆₀₀-arvoja (optinen tiheys aallonpituudella, 600 nm. optical density 600) tutkittavasta näytteestä. Tämän jälkeen tutkittava näyte laimennetaan kasvualustaan, ja laimennettua näytettä laimennetaan edelleen useamman kerran. Laimennoksista otetaan näytteitä, joita kasvatetaan petrimaljalla. Vertailemalla tutkittavien kantojen kasvatuksien eri laimennoksien tuloksia ja vertaamalla niitä kontrollin laimennosten tuloksiin saadaan arvio kasvunopeudesta tutkittavassa näytteessä ja voidaan verrata eri testattavien tekijöiden vaikutusta hiivan kasvunopeuteen (Thomas ym. 2015) (ks. luku 3.2).

1.3.2 Elinkiertotestit ja kineettiset testit

Hiivalla tehdyissä ikääntymistutkimuksissa on käytetty kahta eri menetelmää: I replikatiivinen elinkierto (tytärsolut, jotka ovat syntyneet yhdestä emosolusta) ja II kronologinen elinkierto (postmitoottisessa tilassa olevien solujen kyky ylläpitää elinvoimaisuutta) (Piper 2006). Postmitoottinen tila syntyy, kun ravinteiden loputtua solut siirtyvät lepotilaan, jolloin ne eivät jakaudu eikä kasva.

Lepotilaan siirtymisen reitti ja sitä ohjaavat geenit ovat hyvin konservoituneet evoluutiossa. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että ravinteiden loputtua hiivasolut eivät nälkiinny, joten ravinteiden loppuminen ei vahingoita hiivasoluja, ja tämä on yksi tärkeä tekijä, joka tekee hiivasta hyvän malliorganismien solun ikääntymisen tutkimisessa (Li ym. 2013).

Noin kolmen kasvatuspäivän jälkeen ravinteet ovat loppuneet kasvustosta, jolloin voidaan aloittaa näytteiden ottaminen. Hiivaa kasvatetaan ravistelukasvatuksina 30 °C:n optimilämpötilassa (Murakami & Kaeberlein 2009).

Kasvustosta otetut näytteet kasvatetaan levyillä ja / tai Bioscreen-laitetta apuna käyttäen, minkä jälkeen elinkykyisten solujen suhteellinen osuus saadaan jokaisesta osapopulaatiosta kasvukinetiikan avulla. Saadut OD₆₀₀ 0,8-arvot ja logistisen käyrän pinta-alat (auc_I) kuvaavat solujen elinvoimaisuutta tiettyinä aikoina (Tonner ym. 2017, Murakami & Kaeberlein 2009). Auc_I-arvot kuvaavat solujen kasvupotentiaalia (Tonner ym. 2017).

Samaa menetelmää voidaan käyttää muutenkin hiivasolujen elinvoimaisuuden analysoinnissa, ja se on yleisesti hyväksytty ja käytetty menetelmä (Koivistoinen ym. 2013).

Alkoholin on todettu vaikuttavan kasvuun ja olevan rajoittava tekijä hiivakasvatuksissa. Hiiva käyttää alkoholia kasvatuksen alussa ravintoaineena ja loppuvaiheessa alkoholi vaikuttaa hiivan kasvuun haitallisesti (Brown ym. 1981).

Pienen ravintomäärän lisääminen voi synnyttää kasvatukseen sekapopulaation, jolloin osa soluista on nuorempia kuin toiset (Fabrizio & Longo 2007).

Sekoitus tehostaa hapen siirtymistä solukalvon läpi, joka parantaa aerobista aineenvaihduntaa ja lisää energian määrää ja parantaa solumassan kasvua (Nielsen ym. 2003). Suuren ravistelunopeuden (300 RPM (kierrosta minuutissa)) ei ole havaittu aiheuttavan mekaanisia vaurioita soluun, vaan se nopeuttaa kasvua ja lopuksi solukuolemaa kuluttamalla ravinteet nopeammin loppuun kasvustossa ja tuottamalla nopeammin haitallisia aineenvaihduntatuotteita (Camacho-Ruiz 2003).

1.4 Ikääntymiseen liittyvät geenit

Tärkeimpiä ikääntymisen tunnusmerkkejä solussa ovat genomien epävakaus sekä solun sisäisen proteiinitasapainon menettäminen. Lisäksi vaikutusta on myös epigenettisillä muutoksilla, joiden arvellaan olevan vuorovaikutuksessa edellä mainittujen tärkeimpien tunnusmerkkien kanssa (Moskalev 2017).

Ikääntymiseen yhdistettävien geenien ja niiden vaikutusten tutkimista on tehty monilla eri malliorganismeilla.

Tärkeitä geenejä, joita on tutkittu *C.elegans*:illa ovat *HSF*- ja *DAF-16*. Näistä muodostuneet proteiinit ovat tärkeitä komponentteja, jotka ylläpitävät proteiinien solun sisäistä tasapainoa tuottamalla vasteen virheellisesti laskostuneille proteiineille (Morimoto 2008).

Vähäisen energiansaannin on havaittu aktivoivan leivinhiiwan *SIR2* (*sirtuiini 2*) -geenin ja pidentävän replikaatiivista ikääntymistä. Geenin ortologeja on löydetty monilta eri organismeilta.

Ylimääräisten kromosomien ribosomaalisten DNA-renkaiden (ERC, Extrachromosomal rDNA circles) kerääntyminen hiivasolun tumaan on havaittu lyhentävän solun elinikää (Sinclair ym. 1997, Kaerberlein ym. 2004).

Mutaatioiden, jotka vähentävät ERC:n määrää, on havaittu pidentävän solujen elinkaarta (Defossez ym. 1999). *SIR2*-geneilla on huomattu olevan vaikutuksia ikääntymiseen vähentämällä ERC:n määrää. *SIR2*-geeniperheen eri lajien ortologeilla vaikutukset ovat erilaiset (Piper 2006). *FOB1*-geeni koodaa Fob1-proteiinia, joka estää replikaatiohaarukan liikkumisen, jonka on havaittu lisäävän ERC:n määrää (Kaerberlein ym. 1999).

Mitokodrioilla on todettu olevan keskeinen rooli ikääntymisessä ja ikääntymiseen liittyvien sairauksien syntymisessä (Uzhachenko ym. 2017).

TLS on translokaatioissa liposarkoomassa (rasvasolujen syöpä) siirtyvä geeni, joka fuusioituu transkriptiotekijän kanssa. Se on synonyymi *FUS*-geenille. *TLS* löydettiin ensimmäistä kertaa ihmisen syöpäsoluista ja erityisesti sitä esiintyy liposarkooman soluissa. Lisäksi sitä on löydetty fibromyxoidisista (pehmytkudosten) sarkoomista (Rabbitts ym. 1993).

FUS-geenin on todettu olevan yhteydessä myös FTDL- ja ALS-sairauksiin (Sun ym. 2011).

Toimivalla *FUS*-geenillä on havaittu merkkejä syöpäkasvaimia vähentävästä vaikutuksesta (engl. tumor suppressor gene) ja sen on havaittu olevan mutatoitunut monessa syöpätyypissä (Rimkus ym. 2017).

FUS-geeni kuuluu *TET*-geeniperheeseen, jotka ovat yhteydessä DNA:n korjausmekanismeihin (Wang ym. 2013). *FUS*-proteiinin on havaittu olevan tärkeässä roolissa hermosoluissa DNA:han syntyneiden virheiden korjaamisessa, ja se on yhteydessä genomien vakauteen (Wang ym. 2013).

DNA:n korjausmekanismien vioittuminen on tärkeässä roolissa hermostorappeumasairauksien syntymisessä sekä ikääntymisessä (Wang ym. 2013).

Korjausmekanismin on havaittu muun maassa perustuvan siihen, että *FUS*-proteiinilla on suora vaikutus histonien deasetylaatientsyymi 1 (HDAC1), joka muokkaa kromatiinia, mikä edelleen käynnistää *FUS*-proteiinin kanssa vioittuneen DNA:n korjausmekanismin (Wang ym. 2013). *FUS* on tärkeässä roolissa DNA-kaksoisjuosteen katkeamisen korjaamisessa. Tämän vuoksi *FUS*-proteiinin menetettyä toimintakykynsä hermosoluissa syntyy runsaasti mutaatioita, ja tämä voi johtaa genomien epävakauteen (Wang ym. 2013).

1.5 SBC003-yhdiste

SBC003-yhdiste on luonnonyrtistä eristetty molekyyli, joka on potentiaalinen lääke hermostorappeuma sairauksiin (SunRegen Healthcare AG. julkaisematon tulos).

Aikaisemmat hermostorappeuma-IPSC-sairausmalleilla tehdyt tutkimukset osoittavat yhdisteellä olevan voimakas konsentraatiosta riippuvainen, haitallisilta proteiiniaggregaateilta hermosoluja suojaava vaikutus (SunRegen Healthcare AG. julkaisematon tulos).

Tutkimuksissa käytettiin IPS-soluja joita on muokattu taudin patogeenisten ominaisuuksien matkimiseksi.

Tutkimuksessa käytettiin Alzheimerin taudin, Parkinsonin taudin ja Creutzfeldt–Jakobin taudin malleja (SunRegen Healthcare AG. julkaisematon tulos).

Tutkimuksissa, joita on tehty villityyppisellä hiivakannalla SBC003-yhdisteellä, on havaittu sen hidastavan myös normaaliin ikääntymiseen

yhdistettävien haitallisten proteiiniaggregaattien kertymistä soluun (Caudron, julkaisematon tulos).

2 TYÖN TAVOITTEET

Työn tavoitteena oli selvittää:

- 1 Voidaanko hiivasairausmalleja käyttää SBC003-yhdisteen vaikutuksien arvioimiseen hermostorappeumasairauksissa ja onko tutkittavalla yhdisteellä pelastava vaikutus näissä malleissa?
- 2 Onko SBC003-yhdisteellä vaikutusta hiivan postmitoottiseen (kronologiseen) ikääntymiseen?

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 SBC003-yhdisteen esivalmistelu

Tehtiin 10 millimolaarista SBC003-etanoliliuosta. Otettiin -70 °C:n pakkasesta SBC003-pulveria (SunRegen Healthcare AG) Falcon-putkeen ja lisättiin esilämmitettyä (35 °C) puhdasta etanolia (Aa-ETAX).

Vorteksoitiin SBC003-etanoliliuosta 5 minuuttia huoneenlämpötilassa. Sonikoitiin vesikylvyssä (35 °C) SBC003-etanoliliuosta 30 minuutin ajan.

Inkuboitiin seosta 1 tunti 35 °C:ssa (SunRegen Healthcare AG, julkaisematon tulos).

3.1.1 Kasvualustat

Hiivan kasvualustana (YPD) käytettiin seosta joka sisältää puhdasta vettä, 1-prosenttia hiivauutetta, 2-prosenttia peptonia ja 2-prosenttia hiililähdettä. Käytimme hiililähteenä testeissä raffinoosia, galaktoosia tai näiden seosta sekä glukoosia. Hiililähde on tapauskohtaisesti mainittu tekstissä ja kaavioissa.

Kaikki ravintoalustat saatiin valmiiksi tehtyinä (Biotekniikan instituutin elatus keittiöstä). Kuumensimme seoksen ja lisäsimme halutun määrän hiililähdettä ennen kasvualustan käyttöä. Kiinteisiin kasvualustoihin oli lisätty 2-prosenttia agaria.

3.2 Spottitestit

Siirrostettiin jokaista tutkittavaa hiivakantaa 3 ml glukoosi-YPD-alustalle 10 ml koeputkiin. Kasvatettiin yön yli 30 °C:ssa koeputkipyörittimessä.

Sitten laimennettiin kasvualustalla, jossa oli raffinoosi hiililähteenä niin, että lopullinen OD₆₀₀ oli 0,2. Kasvatettiin kolme tuntia koeputkissa koeputkipyörittimessä ja säädetiin OD₆₀₀ yhteen. Mitattiin OD₆₀₀ jokaisesta laimennetusta näytteestä. Laskettiin konsentraatio (c), joka perustuu OD₆₀₀-arvoihin. Sitten laskettiin pipetoitava tilavuus (v), joka perustuu konsentraatioon ja haluttuun näytetilavuuteen (500 µl). Lopuksi OD₆₀₀ oli kaikille näytteille 1. Käytimme laskuissa kaavaa $c_1 * v_1 = c_2 * v_2$. Pipetoitiin laskettut määrät näyteitä Eppendorf-putkiin. Täytettiin ravintoliuoksella, jossa 2-prosenttista raffinoosia hiililähteenä niin, että lopullinen tilavuus oli 1 ml. Sentrifugoitiin näytteet (10 min 800 RPM) ja poistettiin nestefaasi. Laimennettiin solut haluttuun konsentraatioon lisäämällä ravintoliuosta, jossa 2-prosenttista raffinoosia hiililähteenä niin, että lopputilavuus oli 500 µl.

Pipetoitiin kaikkiin Eppendorf-putkiin 400 µl ravintoalustaa, jossa 2-

prosentista raffinoosia hiililähteenä. Tehtiin viisi laimennosta jokaisesta näytteestä. Pipetoitiin 100 µl laimennettua näytettä aina seuraavaan koeputkeen, jossa oli 400 µl kasvualustaa niin, että seuraava putki oli aina viidesosa edellisen putken konsentraatiosta. Pipetoitiin jokaista laimennettua näytettä 2 µl petrimaljan ravintoalustalle käyttämällä maljan alla pistekuvioitua paperia merkitsemään näytteen paikan. Kasvatettiin staattisesti 2 vuorokautta 30 °C:ssa (Thomas ym. 2015).

3.2.1 Induktiospottitestit

Induktiospottitestit tehtiin, koska halusimme testata hiivamallien tautigeenin induktion riippuvuutta galaktoosikonsentraatiosta ja sen vaikutusta hiivan kasvuun. Induktiospottitestit tehtiin edellisessä kappaleessa olevan menetelmän mukaan, mutta koejärjestelyssä eri YPD-alustoille laitettiin eri galaktoosipitoisuudet: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 prosenttia. Jokaiseen alustaan lisättiin myös raffinoosia niin, että kaikissa alustoissa kokonaishiililähteen määrä oli yhteensä 2-prosenttia.

3.2.2 Spottitesti SBC003-yhdisteen vaikutuksen testaamiseksi

Spottitesti SBC003-yhdisteen vaikutuksen testaamiseksi tehtiin kappaleessa 3.2 kuvatun menetelmän mukaan. Testien kannalta selkeimmäksi galaktoosi-induktiokonsentraatioksi aikaisemmin tehdyissä galaktoosi-induktio testeissä osoittautui 0,2- ja 0,4-prosentin välissä, joten päätimme toteuttaa kaikki jatkotestit 0,3-prosentin galaktoosi pitoisuudella.

Koejärjestelyissä proteiiniaggregaatteja muodostavia hiivan ihmisen sairautta matkivia malleja indusoitiin 0,3-prosenttia galaktoosia sisältävällä ravintoliuoksella, lisäksi laitettiin myös 1,7-prosenttista raffinoosia.

Koejärjestelyissä kahdelle petrimaljalle, joissa oli galaktoosi hiililähteenä, lisättiin toiseen ravintoliuokseen 30 µM SBC003-yhdistettä, joka oli 30 µl:ssa etanolia ja toiseen laitettiin kontrolliksi 30 µl pelkkää etanolia.

Lisäksi tehtiin kaksi kontrollikasvatusta petrimaljalla, joissa hiililähteenä oli pelkkää 2-prosenttista raffinoosia (ks. luku 3.2). Yhteen alustoista laitettiin 30 µM SBC003-yhdistettä, joka oli 30 µl:ssa etanolia ja toiseen alustoista laitettiin 30 µl puhdasta etanolia.

3.3 Bioscreen-laite

Kineettisissä testeissä käytettiin Bioscreen-laitetta, jolla kasvatettiin hiivaa optimiolosuhteissa.

Näytettä otettiin elinkiertokasvatuksesta Bioscreen-testiä varten aina 20 µl, joka laimennettiin 580 µl:lla 2-prosenttisella glukoosi-YPD-ravintoliuoksella 1:30:een, ja pipetoitiin 96-kuoppaiselle muovilevyille.

Laimennettua tutkittavaa näytettä pipetoitiin jokaiseen kaivoon kaikissa testeissä 150 µl. Näytteistä tehtiin kolme teknistä replikaattia.

Kasvualustan puhtauden varmistamiseksi tehtiin myös kontrolli pelkästä kasvualustasta, johon ei lisätty hiivanäytettä.

Käytimme kasvatuksissa hiivan optimikasvulämpötilaa 30 °C. Lisäksi kasvatuksissa käytettiin suurta sekoitusnopeutta (300 RPM).

Näytteitä kasvatettiin 30 tuntia 96-kuoppaisella muovilevyllä, joka asetettiin Bioscreen-laitteen sisään.



Kuva 6. Bioscreen-laitteisto. Kuvassa on Bioscreen-C MBR-laitteisto, jota käytimme testeissä. Bioscreen-laitteen valmistaja on Oy Growth Curves Ab Ltd.

Bioscreen-laite mittasi absorbanssin asetetuin säännöllisin väliajoin, ja kokeessa käytettiin mittausväleinä 15 minuuttia. Absorbanssi mitattiin 600 nm (OD_{600nm}) aallonpituudella (ks. kuva 6).

Elinkiertokasvatuksien Bioscreen-laitteesta saadut mittaustulokset analysoitiin ja käsiteltiin R / RStudio 3.5.2 Growth Curver kitin avulla (<https://www.rstudio.com/>) ja Excel-ohjelmalla (<https://www.microsoft.com/fi-fi/>).

Kineettisten kokeiden tulokset käsiteltiin RStudio Growth Curver kitillä ja Prism Graphpad ohjelmalla (versio 8) (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>)

R/Studiosta Growth Curver kitillä saatiin tuloksena kaavio, josta käy ilmi seuraavia tietoja:

K on suurin mahdollinen määrä mitä populaatio voi kasvaa tässä ympäristössä. Tämä on kasvatuksen kantokyky eli teoreettinen kasvun maksimi.

n₀ tai N_0 on populaation koko kasvatuksen alussa.

r on populaatio kasvunopeus, jonka se voi saavuttaa, ellei kasvulle ole asetettu rajoituksia.

t_{mid} on aika, jolloin populaatio on kasvanut puoleen teoreettisesta maksimiarvosta $\frac{1}{2} K$.

t_{gen} on kasvatuksen nopein mahdollinen generaatioaika, jota kutsutaan myös tuplaantumisajaksi. Tämä on lyhin aika, jossa solumäärä kaksinkertaistuu kasvatuksessa. Tämä kuvaa solun elinvoimaisuutta.

auc_I on logistisen käyrän alle jäänyt pinta-ala. Ohjelma ottaa integraalin logistisesta yhtälöstä ja laskee käyrän alle jääneen pinta-alan. (Area under the logistic curve obtained by taking the integral of the logistic equation) (Sprouffske 2018). Auc_I yhdistää arvot k , r , ja N_0 samaan lukuun. Luku kuvaa myös kasvuston kasvupotentiaalia ja elinvoimaisuutta (Tonner ym. 2017).

auc_e kuvaa kasvukäyrän kokonaispinta-alaa. Ohjelma summaa lukuun kaikkien empiiristen mittaustulosten arvot ja laskee kuvaajan alle jääneen pinta-alan.

Sigma-arvo tarkoittaa, kuinka hyvin mitattu data sopii logistiseen yhtälöön: mitä pienempi sigman-arvo on, sen paremmin se sopii logistiseen yhtälöön (Sprouffske 2018).

Lisäksi mittasimme koneen OD₆₀₀-arvoista aikaa, jolloin kasvusto saavuttaa 0,8 kohdan. Kulunutta aikaa käytetään solujen elinvoimaisuuden arvioimisessa.

3.4 Elinkiertotestit

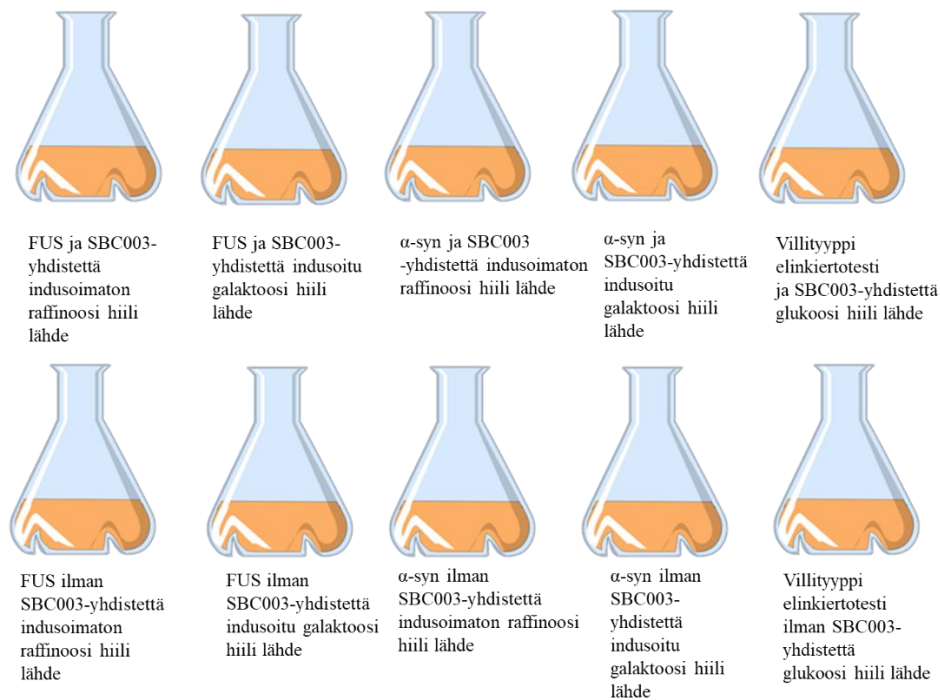
Teimme elinkiertotestin soveltaen Murakami & Kaeberlein 2009 videossa ja artikkelissa kuvattua menetelmää.

Otettiin -70 °C:n pakkasesta tutkittavia hiivakantoja ja siirrostettiin petrimaljalla olevalle YPD-ravintoalustalle. Kasvatettiin staattisesti hiivakantoja 2-3 vuorokautta 30 °C:ssa.

Petrimaljalta siirrostettiin yksittäinen pesäke kasvustosta Ependorf-putkeen, jossa oli 3 ml ravintoalustaa, ja hiililähteenä oli 2-prosenttista glukosia. Kasvustoa kasvatettiin yön yli.

Seuraavana päivänä siirrostettiin kasvustoja koeputkiin, joihin oli laitettu 5 ml YPD-alustaa, jossa oli hiililähteenä 2-prosenttista raffinoosia. Sitten

kasvatettiin 30 °C:ssa koeputkipyörittimestä pyörimisnopeudella 40 RPM kolme tuntia tai kunnes OD₆₀₀-arvo on noin 0,8. Mitattiin OD₆₀₀-arvo spektrometrillä. Laskettiin pipetoitava määrä kaavalla $c_1 \cdot v_1 = c_2 \cdot v_2$.



Kuva 7. Elinkiertotesti I. Kuvassa elinkiertotesti I käytetyt koejärjestelyt. Testissä testattiin SBC003-yhdisteen vaikutusta galaktoosilla indusoituun FUS ja α -synukleiini -hiivakantoihin, ja verrattiin niitä indusoimattomiin raffiinoosissa kasvaneisiin hiivakasvustoihin SBC003-yhdisteen kanssa ja ilman. Lisäksi testasimme yhdisteen vaikutusta glukoosissa kasvaneeseen villityyppiseen hiivakantaan.

Siirrostettiin hiivakannat erlenmayer-pulloihin, joissa oli YPD-alustaa, jossa hiililähteenä oli 2-prosenttia glukoosia (tai geenimuunnelluille kannoille hiililähteenä oli 0,3-prosenttista galaktoosia ja 1,7-prosenttista raffiinoosia (indusoitu) tai kontrollissa 2-prosenttista raffiinoosia (idusoimaton)) niin, että OD₆₀₀-arvo oli 0,2 ja kokonaistilavuus 10 ml. Lisättiin ohjeen (ks. luku 3.1) mukaan valmisteltua 30 μ l 10 mM SBC003-yhdistettä. Tehtiin myös kontrollikasvatukset muuten samalla tavalla, mutta lisättiin SBC003-yhdisteen sijaan 30 μ l puhdasta etanolia (ks. kuva 7). Laitettiin kasvatukset ravistelijaan 30 °C:seen sekoitusnopeudella 300 RPM.

Otettiin 20 μ l:n näytteet kasvustoista kappaleen lopussa olevan aikataulun mukaan. Kaikki näytteet käsiteltiin ja analysoitiin samalla tavalla.

Lisättiin kolmantena kasvatuspäivänä valmiiksi esikäsiteltyä SBC003-

yhdistettä (ks. luku 3.1) 10 µl niin, että lopullinen SBC003-yhdisteen konsentraatio nousi noin 10 µM. Kontrollikasvatuksiin lisättiin 10 µl puhdasta etanolia. Kasvatuksiin, joissa oli SBC003-yhdistettä, lisättiin kolmen päivän välein SBC003-etanoliseosta niin, että SBC003-yhdisteen konsentraatio nousi lisäyksen jälkeen 10 µM. Kontrolleihin lisättiin vastaava määrä puhdasta etanolia (ks. taulukko alapuolella) ja (Treusch ym. 2011).

Päivä 0 oli aika, jolloin Bioscreen ajot aloitettiin (post-mitoottinen vaihe alkaa). Tätä ennen oli kasvatettu kolme kokonaista päivää siirrostuksen jälkeen (4 vrk) (Piper 2006).

Tehtiin Bioacreater-kasvatukset aluksi kahden päivän välein ja lopuksi harvemmin, seuraavan aikataulun mukaan: 0., 2., 4., 8., 12., 14., 17., 21., 28., ja 33. kasvatuspäivänä.

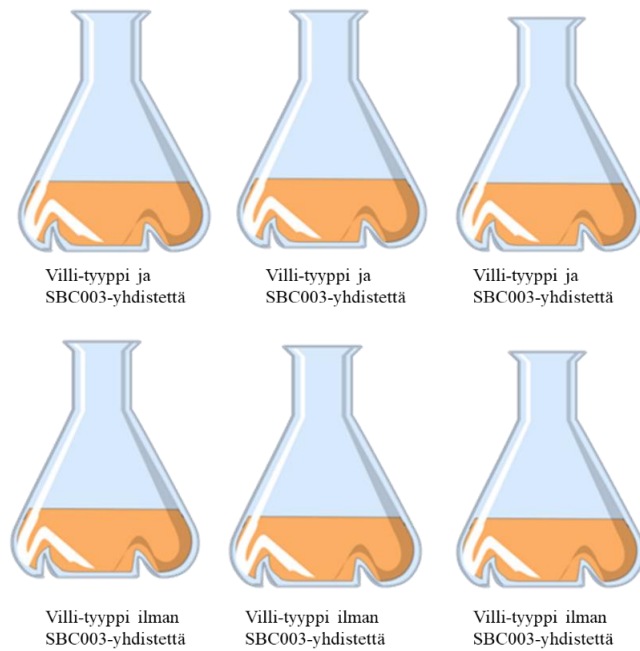
Testeissä kontrolleina olivat myös samat kannat, joiden kasvatuksessa käytettiin YPD-kasvualustaa, jossa oli hiililähteenä 2-prosentista raffinoosia. Lisäksi vertasimme villityypistä kantaa SBC003-yhdisteen kanssa ja ilman yhdistettä. Villityyppisten kasvatusten hiililähteenä käytimme 2-prosentista glukosia. Villityyppiset kasvatukset tehtiin, jotta saataisiin selville olisiko SBC003-yhdisteellä vaikutusta hiivasolun elinkykyyn niiden ikääntyessä.

Näytteitä otetaan kasvustosta, jotka laimennettiin 1:30 YPD-kasvualustaan, joissa oli 2-prosentista glukosia hiililähteenä, ja ajettiin näytteet Bioscreen-laitteella (ks. luku 3.3).

Yhdisteen lisäys tehtiin yhteensä kahdeksan kertaa kasvatuksen aikana niin, että yhdistettä oli lopuksi jokaisessa kasvatuksessa yhteensä 110 µM. Puhdasta etanolia lisättiin vastaava määrä kontrollikasvatuksiin.

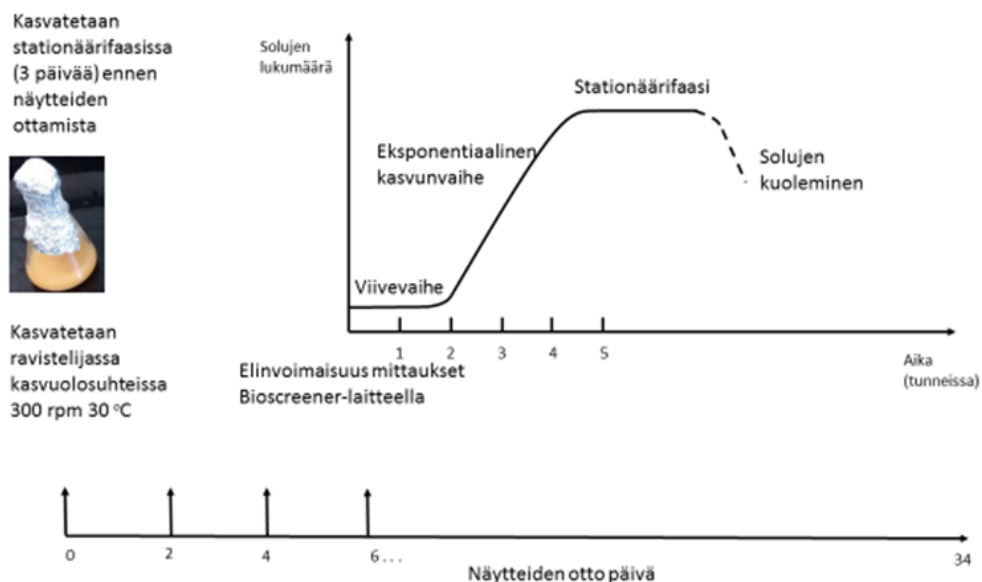
Kasvatuksissa käytettiin 100 ml:n erlenmayer-pulloja, joihin laitettiin 10 ml YPD-ravintoalustaa, jossa oli 2-prosenttia hiililähdettä.

Lisäsimme kasvatuksiin SBC003-yhdiste-etanoliseosta ja kontrollikasvatuksiin pelkkää etanolia seuraavina päivinä: -1., 2., 5., 8., 11., 14., 17 ja 21. Elinkierto testi I (ks. kuva 7) tehtiin yksinkertaisilla koejärjestelyillä. Tämä poikkesi Murakamin ja Kaeberleinin vuonna 2009 käyttämästä menetelmästä.



Kuva 8. Elinkiertotesti II. Elinkiertotesti II koejärjestelyt SBC003-yhdisteen vaikutuksen tutkimiseksi hiivan ikääntymiseen.

Elinkiertotesti II:ssa tehtiin kolme identtistä toistoa villityyppisellä hiiva kannalla. Koejärjestelyissä oli kaikissa kuudessa 100 ml:n erlenmayer-pulloissa 10 ml YPD-alustaa, joissa hiililähteenä oli 2-prosenttista glukosia. Kolmessa kasvatuksessa oli ravintoalustassa myös 30 μ M SBC003-yhdistettä ja kolmessa oli pelkkää etanolia (ks. kuva 8).



Kuva 9. Kronologinen koejärjestely hiivan elinvoimaisuuden tutkimiseksi. Koejärjestelyssä kasvatettiin hiivaa erlenmayer-pulloissa ravistelijassa optimiolosuhteissa. Hiivasolut siirtyivät ravinteiden loputtua ei-jakautuvaan tilaan kolmen kasvupäivän jälkeen, jonka jälkeen kasvustosta aloitettiin

ottamaan näytteitä säännöllisin väliajoin. Näytteistä testattiin elinvoimaisuutta siirtämällä ne tuoreisiin 2-prosettisiin glukoosikasvuliuoksiin ja ajamalla ne Bioscreen-laitteessa.

Analysoitiin saatu data Excel-ohjelmalla (2016) ja R/RStudio (versio 3.5.2) Growth curver kit-ohjelmalla.

Käytimme elinvoimaisuutta mittaavina arvoina OD_{600} 08 ja auc_I-arvoa (Tonner ym. 2017).

Tämä poikkesi Murakamin ja Kaeberleinin vuonna 2009 käyttämästä menetelmästä.

Analyysissä käytimme Excelin t-testiä (Vaux, 2014). Käytimme kaksisuuntaista testiä, koska emme halunneet olettaa ennen t-testin tekemistä onko yhdisteellä positiivinen vai negatiivinen vaikutus elinvoimaisuuteen. Valitsimme merkitsevyystasoksi 0,05.

Krononologisen elinkiertoikasvatuksen Bioscreenajon tuloksista nähdään solujen elinvoimaisuuden muutokset elinkiertoikasvatuksen aikana (Murakami & Kaeberlein 2009).

3.5 Käytetyt hiivakannat

Käyttämissämme sairausmalleissa sairauden mallintamiseksi on lisätty kyseistä sairautta aiheuttava ihmisen geeni. Geenin ilmetessä muodostuu samantyyppinen haitallinen proteiiniaggregaatti kuin tautiin sairastuneella ihmisellä, ja tällä on tarkoitus matkia samankaltaisia haitallisia vaikutuksia kuin ihmisen hermostorappeumasairautta sairastavien potilaiden hermosoluissa (ks. luku 1.2.1). Sairautta aiheuttava geeni on laitettu *GAL*-promoottorin säätelyn alaiseksi. Tämä tarkoittaa sitä, että geeni ilmenee vain, kun galaktoosia on hiivan hiililähteenä. *GAL*-promoottorin alaiseksi on laitettu myös GFP-proteiinia koodaava geeni. Tautia aiheuttavan geenin ja *GFP*-geenin ilmenemisen määrä riippuu galaktoosin konsentraatiosta kasvuliuoksessa (Treusch ym. 2011, Caraveo ym. 2014, Duennwald ym. 2006, Sun ym. 2011, Johnson ym. 2008). Käytimme myös kontrollina hiivakantaa, johon oli lisätty *GFP*-geeni, mutta ei proteiiniaggregaattia koodaavaa tautigeeniä. Tällä pyrittiin sulkemaan pois geenimuuntelun mahdollinen vaikutus hiivakantaan. Lisäksi käytimme villityypistä kantaa kontrollina, jota käytettiin myös geenimuuntelun vaikutuksen pois sulkemiseksi.

Taulukko 1. Hiivakannat. Alla olevassa taulukossa on testeissä käytetyt hiivakannat, niihin lisätyt geenit, markkerigeenit sekä markkerit, joita ovat taulukossa alapuolella olevat *GFP*, Matalpha (pariutumiseen yhdistetty alue) can (kanamysiini resistenssin aiheuttava geeni), his (histidiini aminohappo), ade (adeniini), trp (tryptofaani), leu (leusiini aminohappo) ja ura (urasiili) ja ade (adeniini aminohappo). *Aβ42*-geeni (Alzheimerin tauti), *Htt-72Q* (Huntingtonin tauti) -geeni, *TDP43*-geeni (ALS ja FTDL), *α-synnukleiini*-geeni (Parkinsonin tauti) ja *FUS*-geeni (ALS ja FTDL).

Hiivakanta	Hiivakantoihin tehtyt geneettiset muokkaukset ja markkerigeenit
β-amylaasi	Matalpha, <i>Aβ42</i> : LEU2 can1-100, his3-11.15. leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1
α-synnukleiini	Matalpha, <i>α-synnukleiini-GFP</i> : URA3, alphaSyn-GFP:TRP1 can1-100, his3-11.15. leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1
TDP-43	Matalpha, <i>TDP43-GFP</i> :HIS3, TDP43- 784 GFP:TRP1 can1-100, his3-11.15. leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1
FUS	Matalpha, <i>FUS</i> :HIS3, can1-100, his3-11.15. leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1
HTT	Matalpha, <i>HTT-GFP</i> :HIS3, can1-100, his3- leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1
GFP	Matalpha, <i>GFP</i> : HIS3, GFP: TRP1, can1-100, his3-11.15. leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1
villityyppi	Matalpha, URA3, TRP1, can1-100, his3-11.15. leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1

3.5.1 α-synnukleiinihiivakanta

α-synnukleiinihiivakantaan on lisätty *GAL*-promoottorin säätelyn alaiseksi geeni, joka koodaa α-synnukleiinin eri muotoja. Lisäksi siihen on lisätty GFP:tä koodaava geeni. Kun α-synnukleiini menettää toimintakykynsä, se ei kohdennu sen tyypilliselle paikalle solussa, vaan sen määrä kasvaa ja se sakkautuu sekä muodostaa haitallisia kappaleita, jotka aiheuttavat sytotoksisuutta. Tällä tavalla pyritään matkimaan ja havainnollistamaan Parkinsonin taudin mekanistisia vaikutuksia soluun. Haitallisten kappaleiden muodostus tapahtuu samaan tapaan geenimuunnellussa hiivasairausmallin solussa (ks. kuva1) sekä Parkinsonin tautia sairastavan potilaan soluissa (ks. luku 1.2.3) (Khurana & Lindquist 2010).

3.5.2 β -amylaasihiivakanta

Alzheimerin taudin patogeenisen tilan matkiminen on ollut vaikeaa hiivasairausmalleilla. Hiivan hermostorappeuma sairauksia matkivilla kannoilla on pystytty havaitsemaan toiminnallinen yhteys β -amylaasin haitallisuuden endosytoottisen liikenteen ja Alzheimerin taudin välillä. Haitallisin β -amylaasin partikkeli on $A\beta$ -42-fragmentti, joka tunnetaan nimellä $A\beta$ 1-42 (ks. taulukko 1) (Selkoe ym. 2007). Kun ER-signaalisekvenssi yhdistetään peptidin N-päähän, proteiiniaggregaatit erittyvät plasmamembraanille. Proteiiniaggregaatit kertyvät tällöin hiivasoluseinämän rajoittamana solun sisään (Hugh ym. 1989). Ilmentämällä monia kopioita ss $A\beta$ -42 johtaa sytotoksisuuteen ja $A\beta$ 1-42-oligomerien kerääntymiseen hiivasoluihin. Näin on onnistuttu luomaan hiivasta sairausmalli, jolla pystytään tutkimaan Alzheimerin taudin mekanismeja (Treusch ym. 2011, Teneiro ym. 2013).

3.5.3 HTT-hiivakanta

Hiivassa ei esiinny normaalisti *Htt*-geenin ortologia. Huntingtonin tautia on mallinnettu hiivalla siirtämällä ja ilmentämällä siinä ihmisen mutatoitunutta *Htt*-72Q (Huntingtonin) -geeniä, jolloin syntyy haitallinen proteiiniaggregaatti. Suurin osa hiivamaleista ilmentää pientä kohtaa *Htt*-eksonia, joka koodaa 17 ensimmäistä aminohappoa, joista syntyy poly-Q soluun. Tällä tavalla on onnistuttu luomaan hiivasta sairausmalli, jolla pystytään tutkimaan Huntingtonin taudin mekanismeja (Mason ym. 2011, Duennwald ym. 2006).

3.5.4 TDP-43-hiivakanta

TDP-43-rakenteeseen on lisätty *GFP*-merkki-geeni. Sairautta aiheuttavan viallisen *TDP-43*-geenin luomiseksi *TDP-43*-proteiinin C-terminaalista päätä on muokattu. Kaksivaiheinen PCR-protokolla tehdään, jotta saataisiin monistumaan *TDP-43*-geenin katkaistu versio, joka ei sisällä STOP-kodonna. Tämä katkaistu geeni yhdistetään Gateway-kohtien attB1 ja attB2 väliin yhdessä Kozak-konsensussekvenssin kanssa ja siirretään Gateway-menetelmällä pDONR221-vektoriin (Plasmidi, jota käytetään geenien vektorina). Näin on onnistuttu luomaan malli, jota voidaan käyttää apuna tutkittaessa ALS:n ja FTDL:n tiettyjä muotoja (Johnson ym. 2008).

3.5.5 FUS-hiivakanta

Tutkimuksessa käytettyyn hiivakantaan on sairaus-*FUS*-geenin luomiseksi muokattu geenin C-terminaalinen pää (Sun ym. 2011). Kaksivaiheinen PCR-protokolla tehdään, jotta saadaan monistumaan *FUS*-geenin katkaistu versio, joka ei sisällä STOP-kodonnia. Tämä katkaistu geeni yhdistettiin Gateway-kohtien attB1 ja attB2 väliin yhdessä Kozak-konsensussekvenssin kanssa ja siirrettiin Gateway-menetelmällä pDONR221-vektoriin. Näin on onnistuttu luomaan solumalli, jolla pystytään tutkimaan tiettyjen ALS:n FTDL:n muotoja (Sun ym. 2011).

4 TUTKIMUSTULOKSET JA TOTEUTUS

Työssä käytettiin erityyppisiä koejärjestelyjä, joita olivat spottitestit (ks. kappale 3.2) (Thomas ym. 2015) ja elinkiertotestit (ks. kappale 3.4) (Piper 2006, Murakami & Kaerberlein 2009)). Testeistä saatuja tuloksia esitellään seuraavaksi.

4.1 Spottitestien tulokset

4.1.1 Induktiospottitestien tulokset

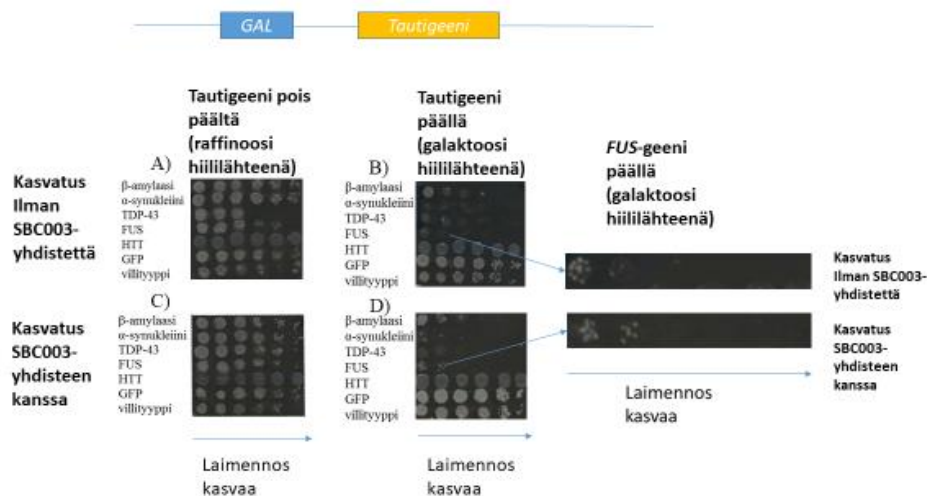
Induktiospottitestit tehtiin α -synukleiini-, β -amylaasi-, TDP-43-, HTT- ja FUS-sairausmalleilla sekä GFP- ja villityyppisellä hiivakannoilla luvussa 3.2 kuvatun menetelmän mukaan. GFP- ja villityyppistä kantaa käytettiin testeissä kontrolleina.

Testin tarkoituksena oli osoittaa, miten paljon erilaiset galaktoosikonsentraatiot vaikuttavat proteiiniaggregaatteja koodaavien geenien induktion seurauksena solujen elinvoimaisuuteen. Tarkoitus oli löytää sopiva galaktoosi konsentraatio tulevia testejä varten, jotta pystyttäisiin selkeämmin erottamaan proteiiniaggregaattien haitalliset vaikutukset sekä toisaalta SBC003-yhdisteen mahdolliset vaikutukset solujen elinvoimaisuuteen.

Havaitsimme kokeessa, että solujen elinvoimaisuus vähenee galaktoosikonsentraation kasvaessa ja lisäksi havaitsimme, että selkein galaktoosi induktio konsentraatio on 0,2- ja 0,4-prosentin välissä. Siksi valitsimme jatkotutkimuksissa käytettäväksi galaktoosi konsentraatioksi 0,3-prosenttia.

4.1.2 SBC003-yhdisteen vaikutuksen arvioimiseksi tehtyjen spottitestien tulokset

Spottitesteillä selvitettiin haitallisten proteiiniaggregaattien vaikutusta hiivan elinkykyyn. Tarkoituksena oli myös selvittää, voidaanko SBC003-yhdisteellä pelastaa hiivasoluja proteiiniaggregaattien haitallisilta vaikutuksilta, ja onko mahdollista tutkia tautimallien hiivasoluilla SBC003-yhdisteen vaikutuksia. Spottitestikasvatukset SBC003-yhdisteen vaikutuksen testaamiseksi tehtiin luvussa 3.2 kuvatun menetelmän mukaan. Spottitesteistä saatiin seuraavanlaisia tuloksia.



Kuva 10. Spottitestikasvatukset SBC003-yhdisteen vaikutusten arvioimiseksi. Spottitestit tehtiin luvussa 3.2 kuvatun menetelmän mukaan. Kasvatukset tehtiin eri hiivakannoilla, joita olivat α -synukleiini-, β -amylaasi-, TDP-43-, HTT-, FUS-sairausmallit, GFP- ja villityyppinen kontrollikannat. Lisäksi kaikissa tautimallien hiivakannoissa oli *GFP*-merkkigeeni.

Kuvasta 10 havaitaan, että 0,3-prosentin galaktoosipitoisuudella staattisissa spottitestikasvatuksissa on huomattava heikentävä vaikutus sairausmallien kasvuun kuvat (B) ja (D) verrattuna kontrollikasvatuksiin (A) ja (C), joissa sairautta aiheuttavaa geeniä ei ole induoitu.

Lisäksi kuvasta havaitaan, että galaktoosikasvualustalla kontrollikannat (villityyppi ja GFP) kasvavat paremmin kuin raffinoosialustalla.

HTT-kanta muodosti laajan mutta läpikuultavan kasvuston, kasvustoissa ei näkynyt solukkoa vaan enemmänkin plakkimaista ainetta mitä on vaikea erottaa kuvista.

Tämä on havaittavissa kaikista HTT-kasvustoista. Kasvatuksessa (D) keskellä FUS-sairausmallissa havaitaan, että kasvua on vielä viisinkertaisessa laimennoksessa SBC003-yhdisteen kanssa kasvaneissa soluissa, mitä ylhäällä olevassa kasvatuksessa (B) ilman yhdistettä ei ole havaittavissa.

Toistimme saman kokeen kolme kertaa, ja jokaisessa toistokokeessa oli nähtävissä vastaava ero kasvussa. Tämä tukee käsitystä SBC003-yhdisteen pelastavasta vaikutuksesta haitallisia FUS-proteiiniagregaatteja vastaan.

FUS-sairausmallit jatkotutkimuksia varten (elinkierroanalyysi I), koska huomasimme tuloksista, että indusoidulla FUS-sairausmallilla, jota kasvatettiin SBC003-yhdisteen kanssa, kasvoi hieman paremmin kuin ilman yhdistettä (ks. kuva 10). Valitsimme α -synukleiinisairausmallin toiseksi verrokki kannaksi jatkotutkimuksiin.

4.2 Elinkiertotestit

4.2.1 Elinkiertotesti I

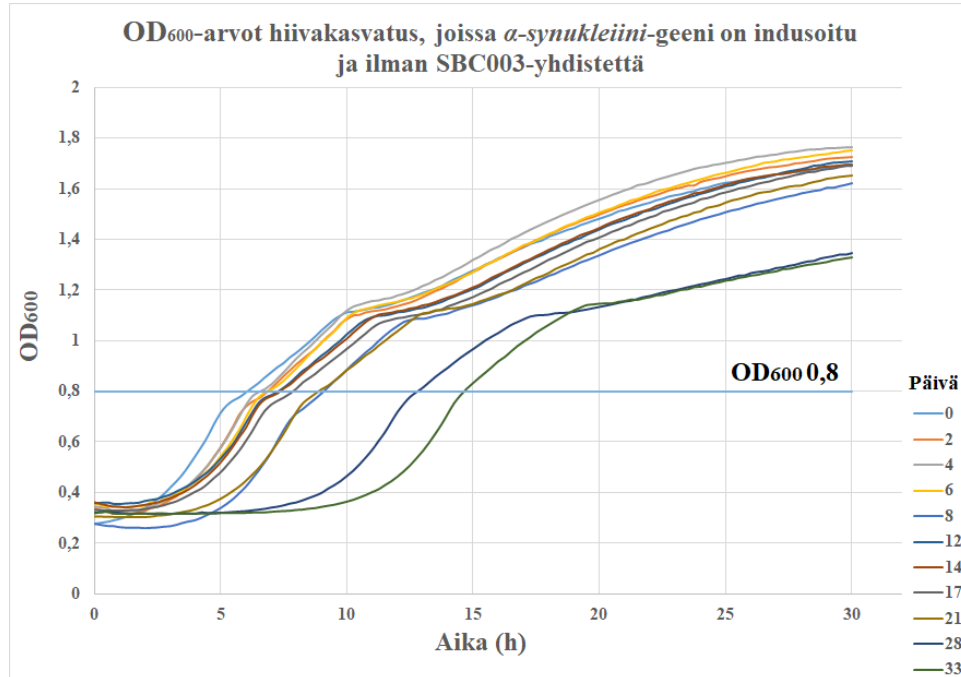
Elinkiertotesti I:ssä testataan SBC003-yhdisteen vaikutusta erilaisiin haitallisia proteiiniaggregaatteja muodostaviin sairausmalleihin ja villityyppisiin hiivakantoihin, joita olivat α -synukleiinisairausmalli ja FUS-sairausmalli.

Elinkiertotesti 1 tehtiin kappaleessa 3.4 olevan ohjeen mukaan katso kuvat 7 ja 9 sekä luvut 1.1, 1.2 ja 1.3 (Murakami & Kaerberlein 2009).

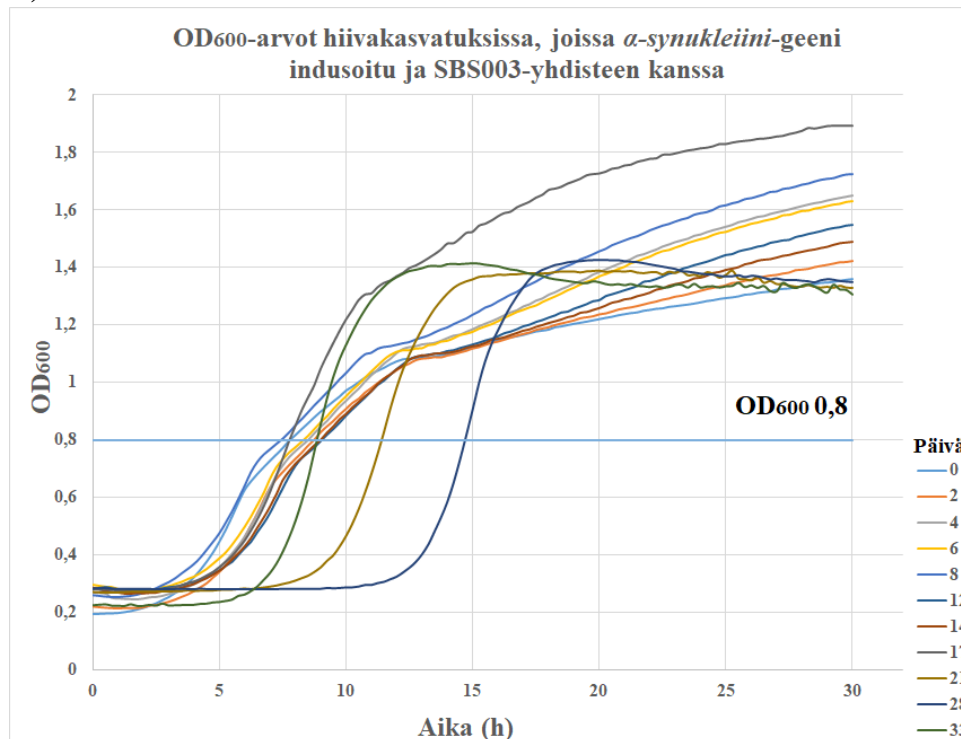
4.2.1.1 α -synukleiinisairausmalli

Seuraavaksi esitellään elinkiertoestien eri aikapisteistä otettujen näytteen Bioscreen-ajoista saatuja tuloksia.

A)



B)

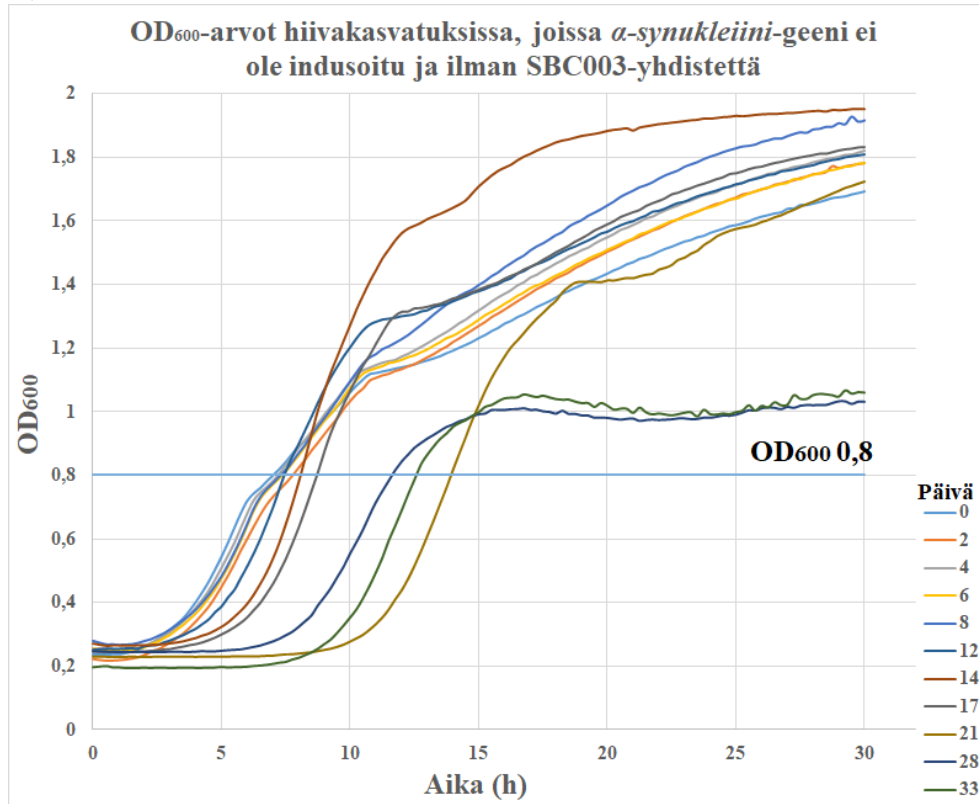


Kuva 11. α -synukleiinisairausmallin elinkiertokasvatus, jonka sairausgeeni on toiminnassa. Kuvassa α -synukleiinisairausmallin elinkiertokasvatuksesta otettujen näytteen Bioscreen-ajoista saatuja OD₆₀₀-mittaustuloksia. Elinkiertokasvatus kaavio (B) kasvoi SBC003-yhdisteen

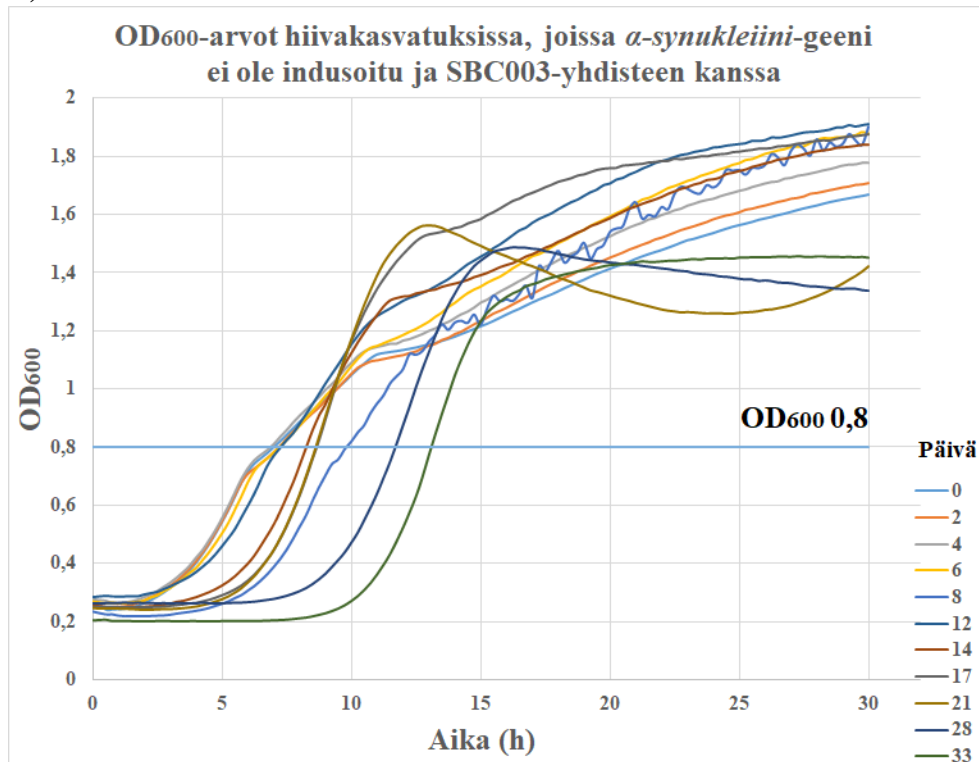
kanssa. Kaaviossa (A) α -synukleiinisairausmallin elinkiertoikasvatus kasvoi ilman SBC003-yhdistettä.

Vertaamalla kuvan 11 (A) ja (B) kaavioita keskenään havaitaan, että varsinkin SBC003-yhdisteen kanssa olevassa kasvustossa solujen vanheneminen ei ollut kovin suoraviivaista, vaan osassa kasvustoista vanhemmat olivat elinvoimaisempia kuin nuoremmat. Lisäksi havaitaan, että SBC003-yhdisteen vaikutuksessa olevan kasvuston kasvukäyrä poikkesi profiililtaan kontrollikasvatuksen kasvukäyrästä.

A)



B)

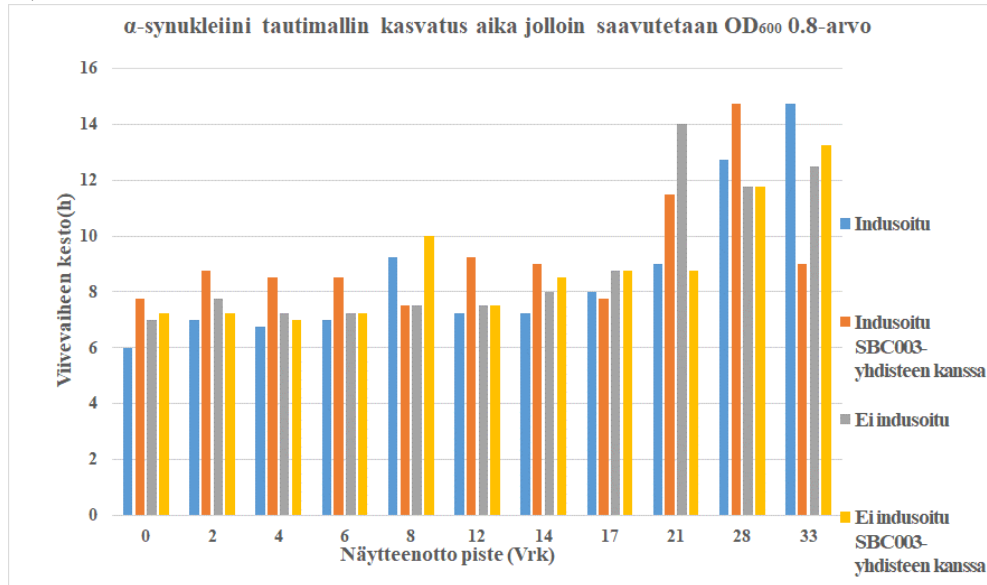


Kuva 12. α -synukleiinisairausmallin elinkiertokasvatus, jonka sairausgeeni ei ole toiminnassa. Kuvassa α -synukleiinisairausmallin elinkiertokasvatuksesta otettujen näytteiden Bioscreen-ajoista saatuja OD₆₀₀-mittaustuloksia. Kaaviossa (B) kasvatuksessa proteiiniagregaatteja koodaavaa geeniä ei ole indusoitu, ja jota kasvatettiin SBC003-yhdisteen

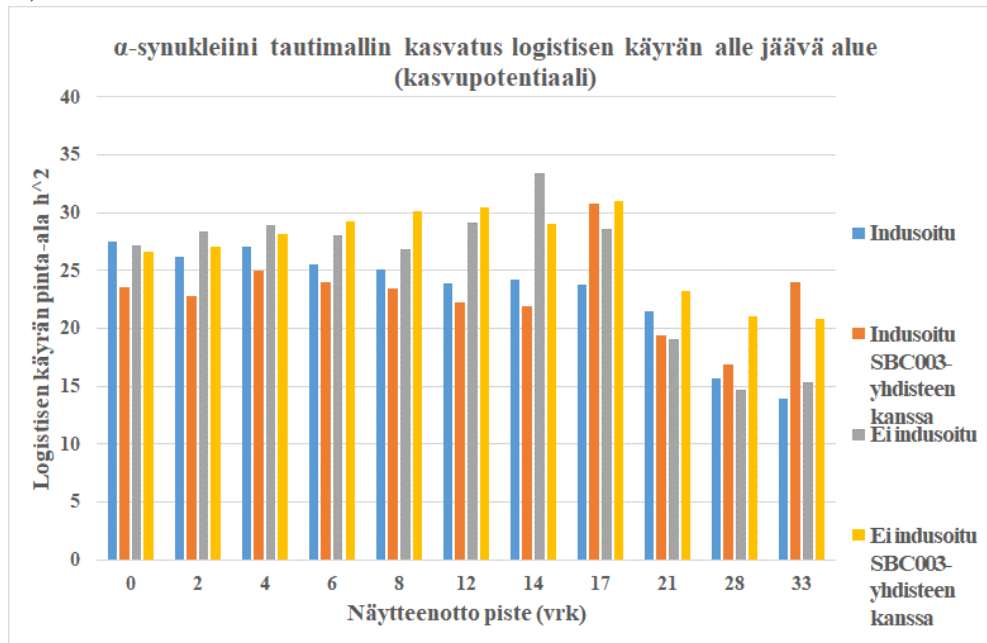
kanssa. Kaaviossa (A) α -synukleiinisairausmallin elinkiertoikasvatus, jota ei indusoitu, ja jossa ei ollut SBC003-yhdistettä.

Vertaamalla kuvan 12 (A) ja (B) kaavioita keskenään havaitaan, että yhdisteen kanssa kasvanut oli elinvoimaisempi kasvatuksen lopussa. Lisäksi huomataan, että SBC003-yhdisteen vaikutuksessa olevan kasvatuksen mittaustulosten kasvukäyrät poikkeavat myös malliltaan toisistaan. Kasvukäyrät SBC003-yhdisteen kanssa muistuttavat malliltaan enemmän toisiaan kuin ilman yhdistettä kasvaneet kasvatukset tautigeenin toiminnasta riippumatta (ks. kuvat 11 ja 12). Vertaamalla kuvan 11 kaavioita kuvan 12 kaavioihin havaitaan, että indusoimattomat ilman SBC003-yhdistettä olevat vanhemmat solut ovat vähemmän elinvoimaisempia kuin nuoremmat, toisin kuin indusoitu kanta mikä oli SBC003-yhdisteen vaikutuksessa.

A)



B)



Kuva 13. Elinkiertotesti I:n α -synukleiinisairausmallin tulokset. Kuvan kaavioihin on koottu yhteen elinkiertotestin I:n Bioscreen-ajoista saatuja tuloksia. Kaavio (A) kuvaa α -synukleiini hiivasairausmallin elinvoimaisuutta eri aikapisteissä. Solujen elinvoimaisuutta kuvaava arvo on aika, joka kestää kasvuston saavuttaa OD₆₀₀ 0,8-arvo. Mitä kauemmin kasvustolla kestää saavuttaa OD₆₀₀ 0,8-arvo, sitä huonommassa kunnossa solut ovat. Sininen pylväs kuvaa hiiva kasvatusta, joka on indusoitu galaktoosilla muodostamaan α -synukleiinia. Oranssi pylväs kuvaa hiivakantaa, joka indusoitiin galaktoosilla muodostamaan α -synukleiinia, lisäksi kasvatukseen on laitettu SBC003-yhdistettä. Harmaa pylväs kuvaa kontrollina käytettyä indusoimatonta hiivakantaa, jonka hiililähteenä on raffinoosia. Keltainen pylväs kuvaa indusoimatonta hiivakantaa, jonka hiililähteenä on raffinoosia, ja johon on lisätty SBC003-yhdistettä. Kaavio (B) α -synukleiinisairausmallin logistisenkäyrän pinta-alat eli auc_I-arvot eri aikapisteissä.

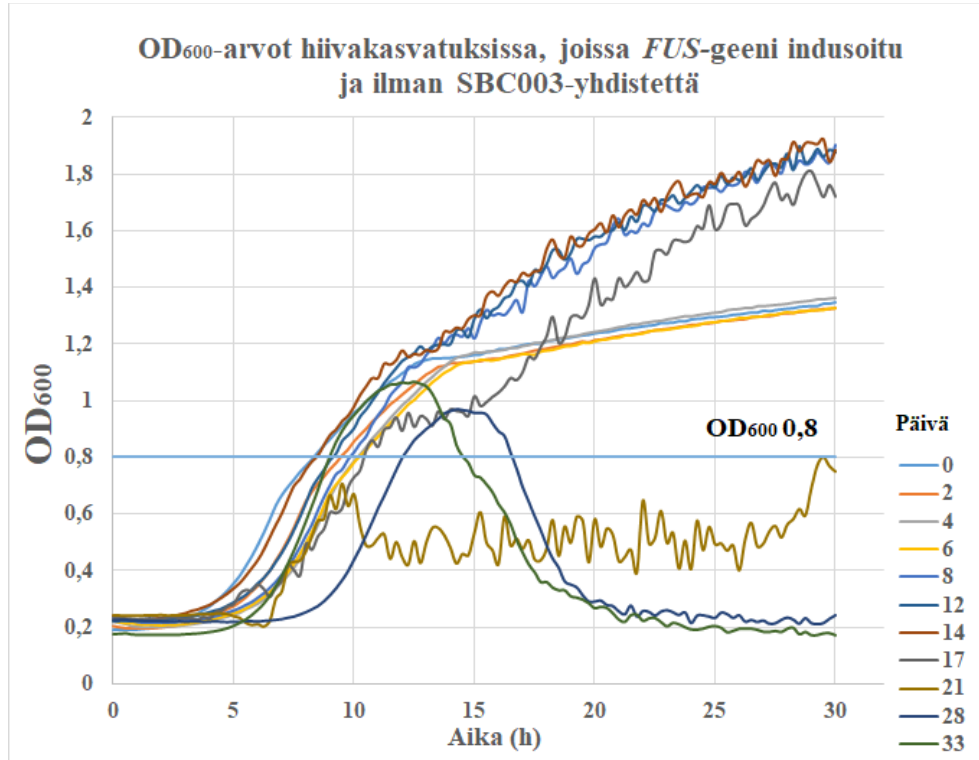
α -synukleiinisairausmallilla tehdyistä elinkiertokasvatuksista (ks. kuva 16) havaitaan, että kasvatuksissa, joissa sairautta aiheuttava geeni on aktiivinen ja jota kasvatettiin SBC003-yhdisteen kanssa, auc_I-arvot ovat elinkiertokasvatuksen loppupuolella suurempia kuin ilman yhdistettä oleva kasvusto (ks. kuva 13 kaavio (B)).

Viimeisessä mittauspisteessä SBC003-yhdisteen vaikutuksessa olevan kasvatuksen aika, jolloin se saavuttaa OD₆₀₀ 0,8-arvon oli huomattavasti lyhyempi kuin ilman yhdistettä oleva kasvatus.

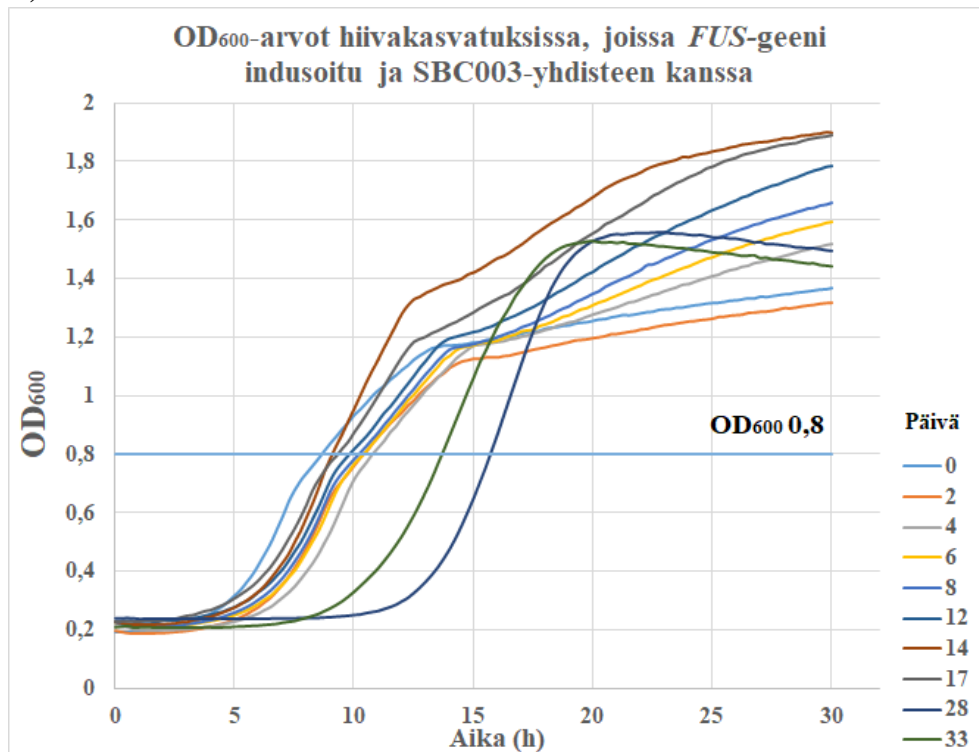
4.2.1.2 FUS-sairausmalli

Seuraavaksi esitellään elinkiertotestien FUS-sairausmallista eri aikapisteistä otettujen näytteiden Bioscreen-ajoista saatuja tuloksia.

A)



B)

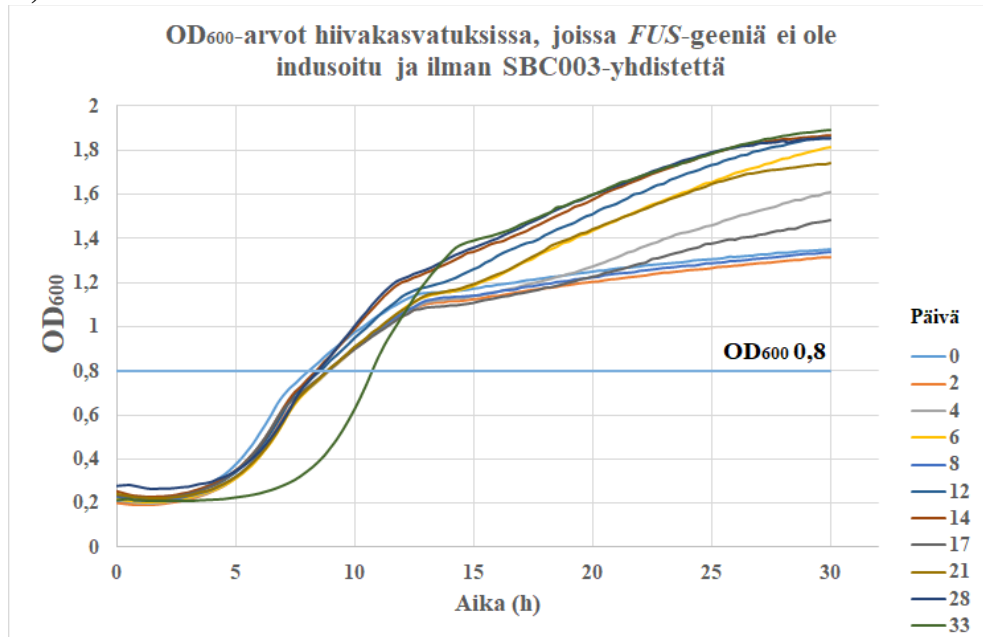


Kuva 14. Elinkiertotesti I:n OD₆₀₀-mittaustuloksia indusoitu kasvatus, jossa *FUS*-geeni on toiminnassa. Kaavioissa on kasvatuksia, joissa *FUS*-geeni on

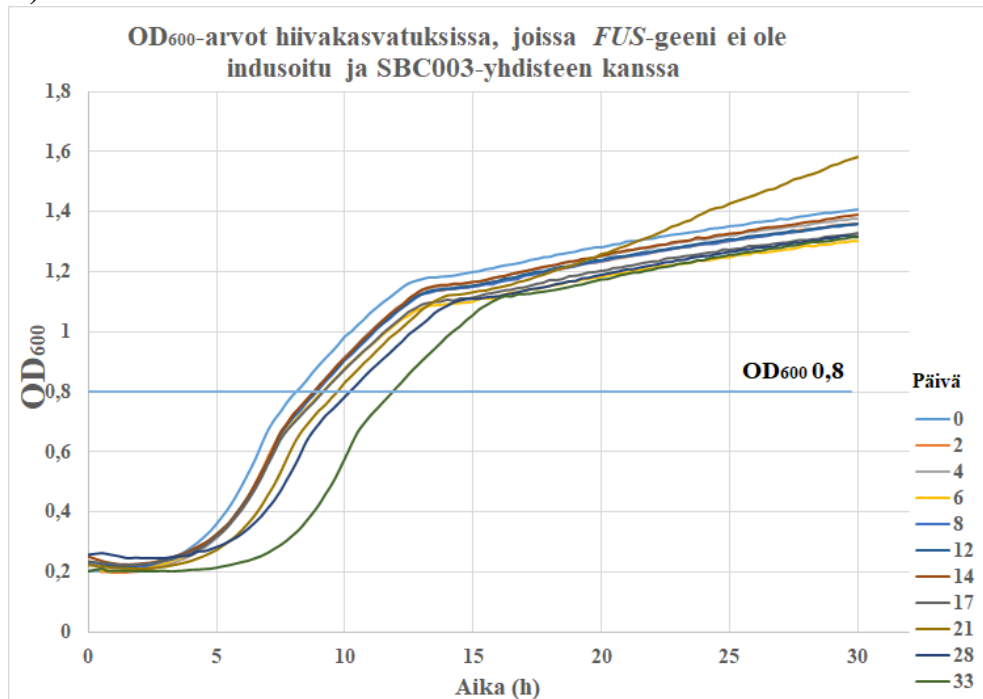
toiminnassa SBC003-yhdisteen kanssa (kaavio (B)) ja sitä verrataan ilman yhdistettä olevaan kasvustoon (kaavio (A)). Kaavioiden eriväriset viivat kuvaavat elinkiertoikasvatuksien I:n ja II:n eri päivinä otettujen näytteiden kasvua. Bioscreen laite mittaa elinkiertoikasvatuksesta otettujen näytteiden OD₆₀₀-arvoja, jotka kuvaavat hiivan elinvoimaisuutta elinkierron aikapisteissä.

Kuvan 14 kaavioista (A) ja (B) havaitaan, kuinka FUS-sairausmallin kasvu muuttuu kasvatuksen aikana. Se, että kasvatus saavuttaa OD₆₀₀ 0,8-arvon muuttuu kasvatuksen aikana suhteellisen vähän, tämän voi havaita kaaviosta. Lisäksi kaaviosta (A) havaitaan kasvatuksen loppupuolella, ettei kasvu jatku tasaisen kasvun vaiheessa kovin pitkään vaan romahtaa lopussa, jo huomattavasti ennen Bioscreen-kasvatusten loppua. Kaaviosta (B) havaitaan kuinka indusoidut FUS-sairausmallin solut SBC003-yhdisteen kanssa kasvavat myös kronologisen ikääntymiskasvatuksen lopussa huomattavasti kauemmin, aina Bioscreen-kasvatuksen loppuun asti. Tämä tukee käsitystämme SBC003-yhdisteen haitallisilta FUS-agregaateilta soluja pelastavasta vaikutuksesta.

A)



B)

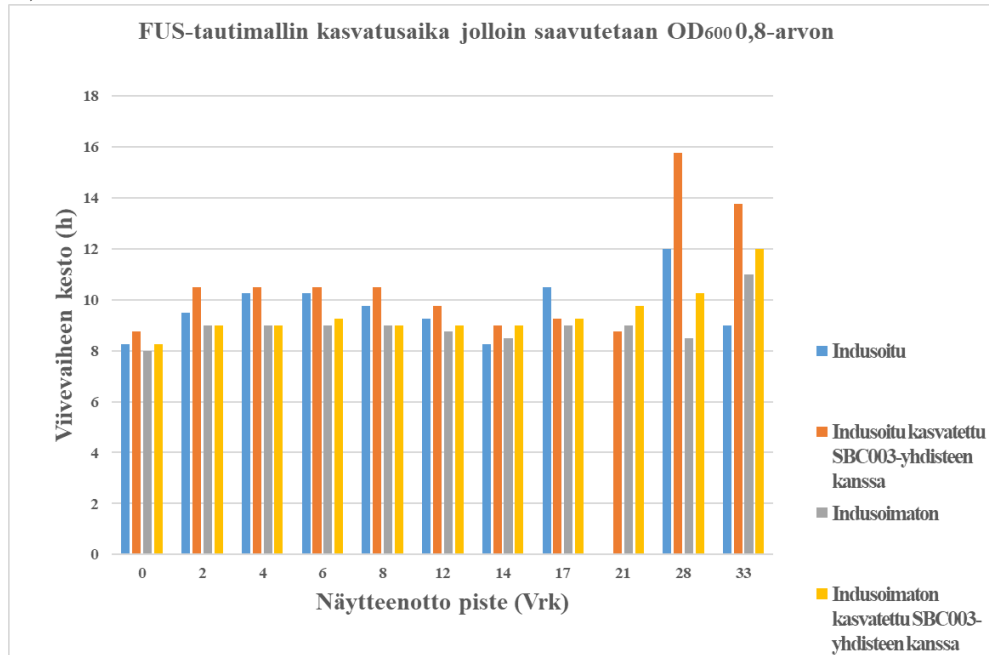


Kuva 15. Elinkiertotesti I:n OD₆₀₀-mittaustulokset kasvatus, jossa *FUS*-geeni ei ole toiminnassa. Kuvassa on *FUS*-sairausmallin kasvatuksien Bioscreen-ajoista saatuja mittaustuloksia, joissa *FUS*-geeni ei ole toiminnassa. Kuvassa verrataan kasvatuksia SBC003-yhdisteen kanssa (B) ja ilman yhdistettä (A).

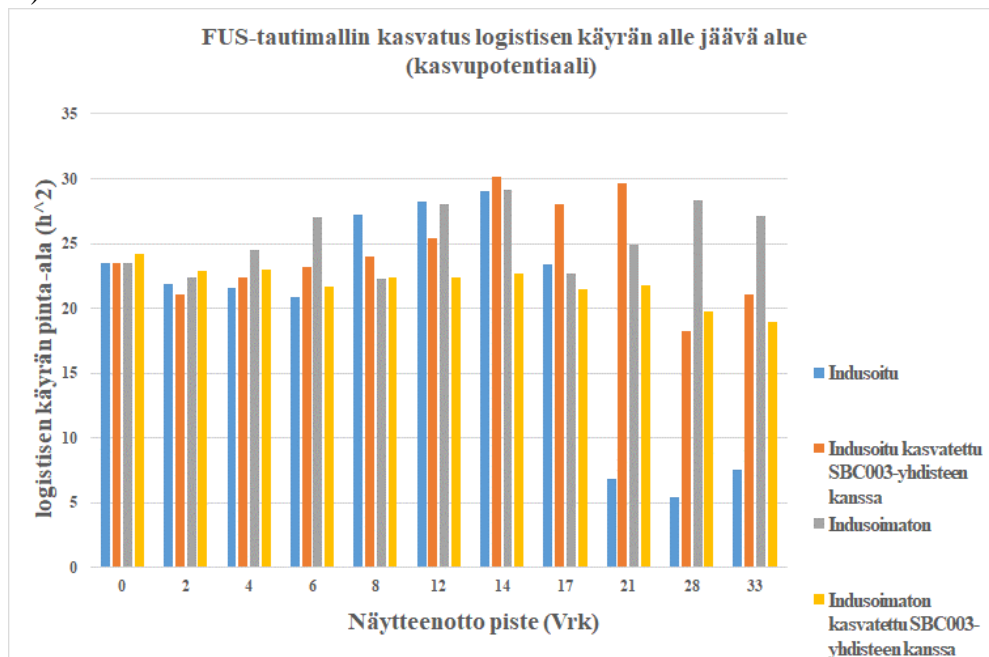
Molemmissa kasvatuksissa kuvassa 15 kasvu on melko hyvää hiivan elinkierron loppuun asti. Ajan muutos, joka kasvustolta kestää saavuttaa OD₆₀₀ 0,8-arvon, on huomattavasti lyhyempi kuin kannoilla, joilla *FUS*-geeni on toiminnassa, mikä oli odotettavissa. Kaaviossa (A) kasvatuksessa ei ole SBC003-yhdistettä. Käyrät kuvaavat eri aikoina otettujen näytteiden

Bioscreen-kasvatusten OD₆₀₀-mittaustuloksia. Kasvatuksista havaitaan kuinka FUS-sairausmalli, jonka *FUS*-geeni ei ole toiminnassa, kasvaa hyvin aina Bioscreenkasvatuksen loppuun saakka. Verrattaessa indusoimatonta sairausmallia (ks. kuva 15) indusoituun sairausmalliin (ks. kuva 14) havaitaan, että proteiiniaggregaattien indusoinnilla on merkittävä vaikutus hiivamallien elinvoimaisuuteen näissä kasvatuksissa.

A)



B)



Kuva 16. Elinkiertotesti 1:n FUS-sairausmallin tulosten analysointi.

Kaaviossa (A) FUS-sairausmallien aika, jolloin kasvatus saavuttaa OD₆₀₀ 0,8-arvon eri aikapisteissä. Kaaviossa (B) on FUS-sairausmallin logistisen käyrän pinta-ala eli auc_I-arvot eri aikapisteissä. Sininen pylväs kuvaa hiivakasvatusta, jonka *FUS*-geeni on indusoitu galaktoosilla. Oranssi pylväs kuvaa hiivakantaa, jonka *FUS*-geeni indusoitiin galaktoosilla, lisäksi kasvatukseen on laitettu SBC003-yhdistettä. Harmaa pylväs kuvaa kontrollina käytettyä indusoimatonta hiivakantaa, jonka hiililähteenä on raffinoosia. Keltainen pylväs kuvaa indusoimatonta hiivakantaa, jonka hiililähteenä on raffinoosia ja johon on lisätty SBC003-yhdistettä.

Kuvasta 16 havaitaan, että SBC003-yhdiste parantaa hiivasolujen elinvoimaisuutta kasvatuksissa, joissa *FUS*-geeni on toiminnassa elinkiertoikasvatuksen loppupuolella.

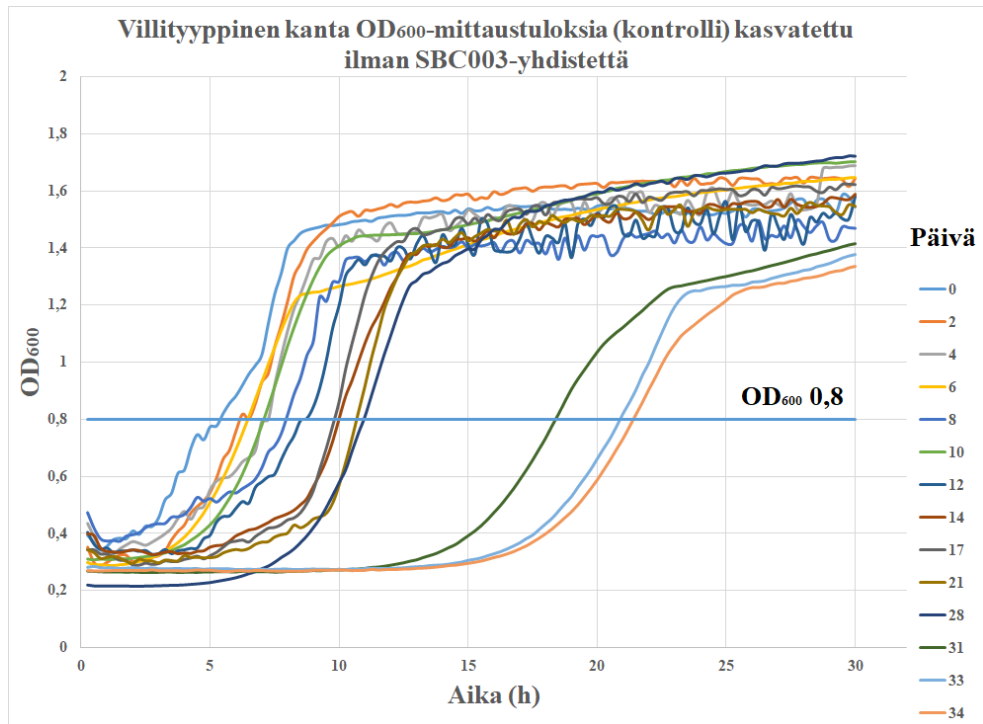
4.2.2 Elinkiertotesti II

Elinkiertotesti II:ssa testattiin SBC003-yhdisteen vaikutusta villityyppisen hiivan ikääntymiseen (ks. luku 3.4) (Elinkiertokasvatus 1:stä poiketen otimme näytteen ja ajoimme myös Bioscreen-ajon 34. päivänä).

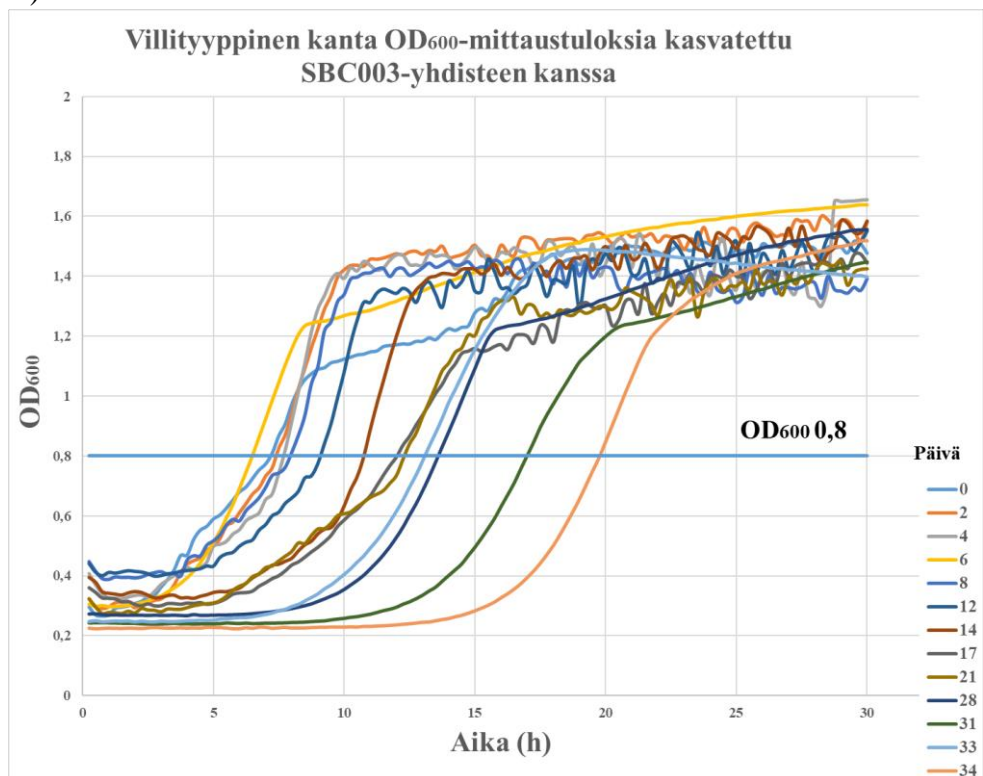
Havaitsimme elinkierto-testi I:ssä eroavaisuuksia solujen elinvoimaisuuteen villityypin hiivakannoilla SBC003-yhdisteen kanssa verrattuna kontrollikasvatuksiin.

Yhdenkertaisen koejärjestelyn perusteella ei pystytäkään tekemään tilastollista analyysiä. Varmistaaksemme elinkiertoanalyysi I saatuja tuloksia päätimme tehdä toistoja villityyppisellä kannalla identtisillä koejärjestelyillä, samalla tavalla kuin elinkierto-testi I:n villityyppisen kannan testit tehtiin. Toisin kuin elinkierto-testi I:ssä elinkierto-testi II:ssä ei tehty sairautta matkivien solumallien kasvatuksia (ks. kuva 8). Seuraavaksi esitellään tuloksia, joita saatiin elinkiertoikasvatuksista tehtyjen Bioscreener-kasvatuksien mittauksista. Kokeiden tavoitteena on saada selville parantaisiko SBC003-yhdiste hiivasolujen elinvoimaisuutta.

A)



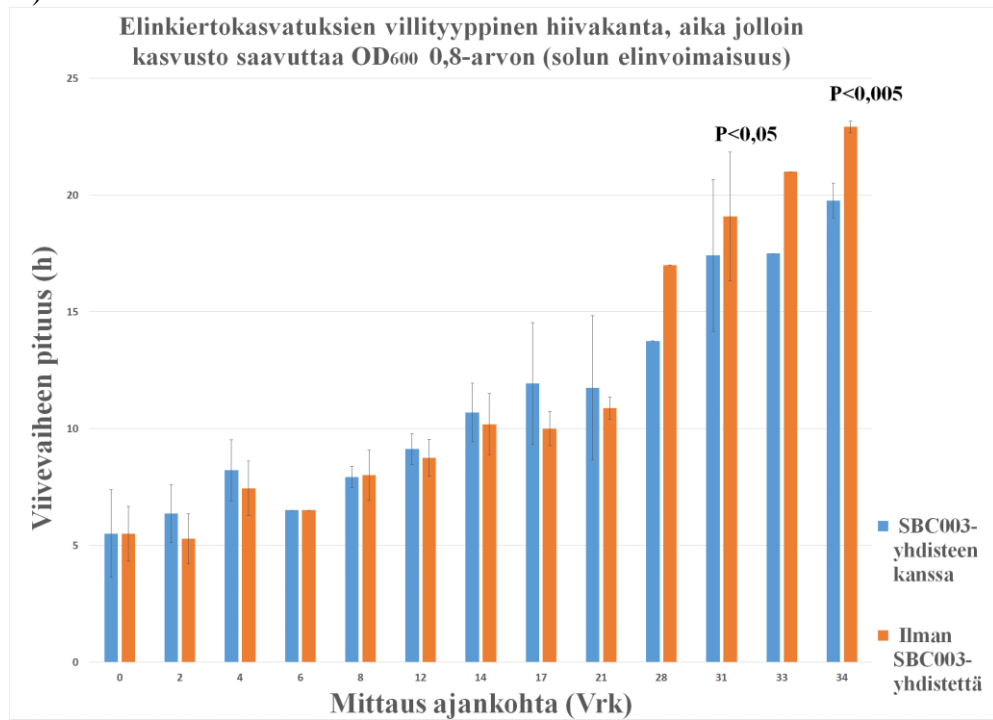
B)



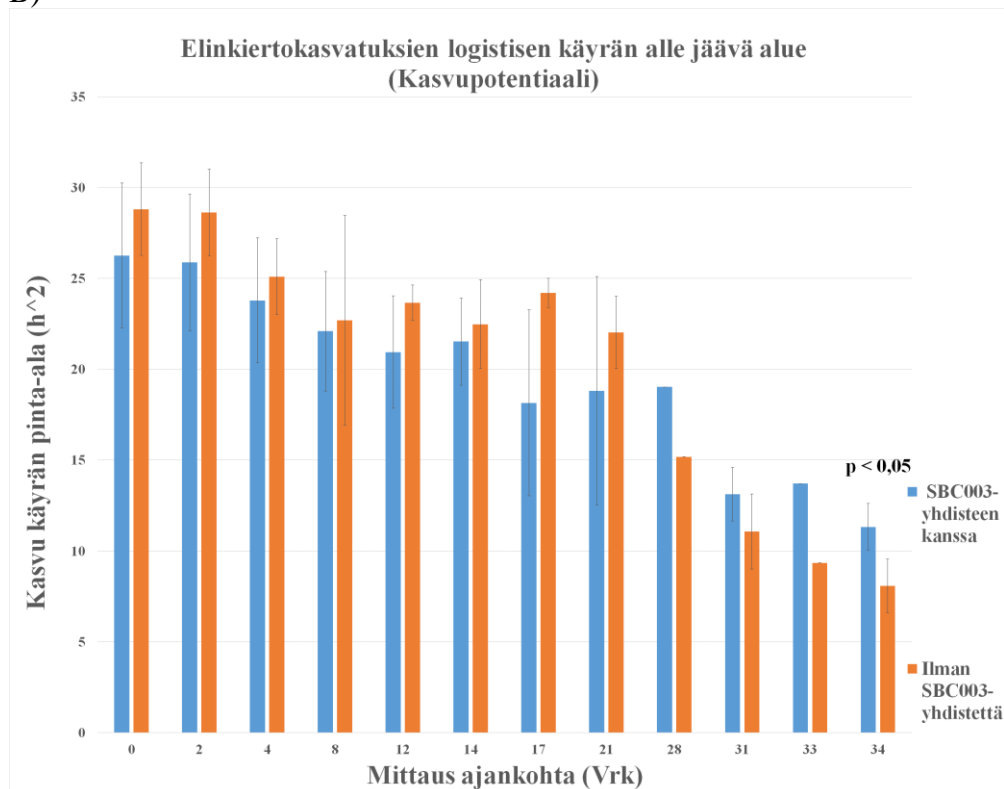
Kuva 17. Elinkiertotestien I:n ja II:n kasvatukset, villityyppiset hiiva kannat. Kuvassa on yhdistetty elinkiertotestien I:n ja II:n eri aikapisteistä otettujen näytteiden, joita on edelleen ajettu Bioscreen-laitteella, saatujen mittaustuloksien keskiarvoja. Kaaviossa (A) on koottu villityyppisen hiivan ravistelukasvatusten tulokset, joita on kasvatettu ilman SBC003-yhdistettä.

Tämä toimii kokeiden kontrollina. Kaaviossa (B) on yhdistetty elinkiertoestien tulokset, joita on kasvatettu SBC003-yhdisteen kanssa.

A)



B)



Kuva 18. Elinkiertotestien I ja II villityyppisten hiivakantojen kasvatusten tulosten analysointi. Kuvan kaavioissa on koottu villityyppisen hiivakannan kronologisten elinkiertoestien I:n ja II:n tuloksia. Kaavion siniset

pylväät kuvaavat kasvatuksien tuloksia, joissa on SBC003-yhdistettä ja oranssit pylväät kuvaavat kasvatuksia, joissa ei ole kyseistä yhdistettä. Pylväät kaaviossa (A) kuvaavat OD₆₀₀ 0,8-arvon saavuttamista eri kasvatuksen aikapisteissä. Kasvatuspäivän kohdalla, jossa ei ole virhepalkkia tarkoittaa, että kasvatuksia on tehty vain yksi kappale.

Kuvasta 18 kaaviossa (A) olevien elinkiertoestien loppupuolen tuloksia tarkasteltaessa OD_{600nm} 0,8 kohdalla havaitaan, että arvon saavuttaminen kestää SBC003-yhdisteen kanssa kasvaneilla kasvatuksen lopussa huomattavasti vähemmän, noin 2 tuntia, kuin ilman SBC003-yhdistettä oleva kasvusto (ks. kuvat 17 ja 18 kaavio (A)). Tämä tarkoittaa, että solut jotka ovat SBC003-yhdisteen kanssa ovat elinvoimaisempia kuin ilman yhdistettä olevat.

Kuvan 18 kaaviossa (B) on koottu elinkiertokasvatuksista otettujen näytteiden Bioscreene-kasvatusten logististen käyrien pinta-aloja. Nämä kuvaavat elinkierokasvatusten kasvupotentiaalia näytteenotto aikapisteessä (Sporouffske 2018). Myös logististen käyrien pinta-aloista, jotka kuvaavat koko kasvupotentiaalia eri hiivan elinkierron aikapisteissä havaitaan, että SBC003-yhdisteen kanssa kasvanut hiivan kasvu oli huomattavasti parempaa etenkin elinkiertokasvatuksen loppupuolella. Tulokset, jotka ovat havaittavissa kuvissa 17 ja 18, tukevat käsitystä SBC003-yhdisteen elinvoimaisuutta parantavasta vaikutuksesta.

5 POHDINTAA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

5.1 Spottitestit

Spottitestien tuloksista havaitaan, että geenin indusointi galaktoosilla vaikuttaa merkittävästi kaikkien hiivasairausmallien elinvoimaisuuteen ja on riippuvainen myös galaktoosin konsentraatiosta (ks. kuva 10).

Tehdyt testit tukevat tältä osin hyvin aikaisempia tutkimustuloksia (ks. Treusch ym. 2011). Lisäksi havaitaan, että sairausgeenin indusointi vaikuttaa eri sairausmalleihin eri tavalla ja aiheuttaa niihin eri ilmiasun (ks. kuva 10).

Staattisissa kasvatuksissa kasvuolosuhteet ovat huomattavasti huonommat hiivan kasvulle kuin ravistelukasvatuksissa, joissa ravistelu tehostaa kasvua (Nielsen ym. 2003).

Huonommat elinolot tuovat soluissa selkeämmin esille proteiiniaggregaattien haitalliset vaikutukset (ks. kuva 10 ja vertaa kuviin (14-18)).

Spottitesteistä SBC003-yhdisteen vaikutuksen testaamiseksi kasvatuksilla, joissa FUS-sairausmallin sairausgeeni oli indusoitu ja joissa oli SBC003-yhdistettä havaitaan, että kasvua oli myös viisi kertaa pienemmässä solukonsentraatiossa verrattuna ilman SBC003 olevaa kasvatusta (ks. kuva 10). Tämä viittaa siihen, että yhdisteellä on pelastava vaikutus FUS-sairausmallin haitallisia proteiiniaggregaatteja vastaan myös hiiva FUS-sairausmallissa (ks. kuva 10).

Muissa spottitestissä käytetyissä sairausmalleissa ei samaa pelastavaa vaikutusta ollut havaittavissa (ks. kuva 10). Tämä poikkeaa IPS-solumalleista (SunRegen Healthcare AG. julkaisematon tulos) saaduista tuloksista.

Nämä eroavaisuudet hiivan ja ihmisen välillä ovat saattaneet syntyä evoluution aikana.

5.2 Elinkiertotestit

Elinkiertotestien alussa ei näyttäisi olevan merkittävää vaikutusta proteiiniaggregaattien induktiolla, eli sairausgeenin indusointi ei näyttäisi häiritsevän juurikaan solujen kasvua eksponentiaalisen kasvun aikana elinkiertokasvatuksien alussa (ks. kuvat 14 - 16). Tämä tulos oli erilainen kuin oletimme spottitestien perusteella (ks. kuva 10).

Solujen elinvoimaisuus elinkiertotesteissä saattaa johtua siitä, että hiivan geenien säätely on muuttunut niin, että se pystyy hiljentämään epigeneettisesti tietynlaisissa suotuisissa olosuhteissa galaktoosilla indusoitavan sairausgeenin tai että hiiva pystyy aktivoimaan haitallisilta proteiiniaggregaateilta suojaavia järjestelmiä.

Tutkimuksemme tukee käsitystä siitä, että hiivalla on monenlaisia biologisia suojaavia mekanismeja useiden erityyppisten haitallisten proteiiniaggregaattien vaikutuksia vastaan (ks. Outeiro & Giorgini 2006). Tämä on kiinnostavaa erityisesti siksi, että samanlaisia suojaavia mekanismeja löytyy myös ihmiseltä. Tämä tarkoittaa sitä, että myös ihmisellä voi olla sisäänrakennettu mekanismi, joka suojaa erilaisten proteiiniaggregaattien haitallisilta vaikutuksilta (Outeiro & Giorgini 2006).

Elinkiertotesteissä käytettiin sekoitusta, joka on hiivan kasvun kannalta suotuisampi olosuhde. Sekoitus parantaa ravinteiden ja hapen diffuusiota soluun sekä kuona-aineiden ja hiilidioksidin eritystä solusta pois (Nielsen ym. 2003), jolloin hiivasolu saattaa pystyä käsittelemään proteiiniaggregaateista johtuvia haitallisia vaikutuksia paremmin. Lisäksi kasvatusta on huomattavasti isompi, joka voi parantaa solujen selviytymistä.

Solut ovat staattisessa kasvatuksessa kontaktissa toisiinsa, jolla voi olla vaikutusta solujen väliseen viestintään.

Tietynlaiset elintavat vähentävät ikääntymiseen yhdistettävien sairauksien syntymistä ihmisellä (Kivipelto ym. 2018). Samasta syystä saattavat tietynlaiset olosuhteet vähentää proteiiniaggregaattien haitallisia vaikutuksia myös malliorganismeissa, kuten hiivassa (vrt. kuvaa 10 kuviin 14-16).

Tuloksiin voivat olla syynä monet erilaiset tekijät, joita tämän tutkimuksen perusteella ei pystytä varmuudella selittämään.

Tämän tuloksen varmistamiseksi pitäisi tehdä lisää kokeita, esimerkiksi käyttäen 1. mutaatioanalyysiä selvittääksemme SBC003-yhdisteen vaikutuksen geenien toimintaan (Outeiro & Giorgini 2006) 2. ddPCR-menetelmää selvittääksemme SBC003-yhdisteen vaikutusta geenien ilmenemisen määrään (ks. kpl. 1.2) (Sanders ym. 2013).

Koeasetelmassa voitaisiin verrata ravistelukasvatusta spottitestikasvatukseen. Tällä tavalla saattaisi selvitä tapahtuuko geenin ilmenemistä sekoituskasvatuksessa *FUS*-geenissä enemmän kuin staattisessa kasvatuksessa. Lisäksi saataisiin selville ilmenevätkö *FUS*-agregaatit suojaavat geenit enemmän tai ilmenevätkö *FUS*-agregaatin haitallisuutta lisäävät geenit vähemmän.

Myös proteiiniaggregaattien määrä olisi hyvä mitata sekä ravistelukasvatuksen hiivasoluilta että staattisen kasvatuksen soluilta. Olisikin mielenkiintoista selvittää miksi kaikissa käytetyissä hiivasairausmalleissa oli havaittavissa sama ilmiö (ks. kuva 10 ja vertaa kuviin 14-16). Ennen laajempaa tutkimusta pitäisi toistokokeilla virheiden mahdollisuus sulkea pois.

Havaitsimme kasvatuksen aikana muutoksia elinvoimaisuudessa. Myöhemmin kasvatuksista otetut näytteet olivat osassa näytteenottopisteissä elinvoimaisempia kuin aikaisemmin otetut.

Lisäsimme kasvatukseen yhdistettä ja etanolia kasvatuksen aikana kahdeksan kertaa (ks. kpl 3.4). Näihin kasvatuksiin muodostui todennäköisesti sekapopulaatioita. Tämän vuoksi emme voineet määrittää

kasvatuksen alkupuolen elivoimaisuutta kuvaavia arvoja tarkasti, siksi emme käytä tulosten analysoinnissa Murakami & Kaeberlein 2009 julkaisussa kuvattua menetelmää.

Ilman etanolin lisäämistä villityypin kontrollikasvatuksemme on samankaltainen kuin Murakami ym. 2008 julkaisussa kuvattu kontrollikasvatus. Vertaamalla ikääntymiselinkiertotestin kontrollikasvatusta kuva 21 kaavio A Murakami ym. 2008 kuva 2 kaavio A:ta keskenään havaitaan, että kasvatuksien nollakohdissa tekemämme kontrollikasvatukset ovat elinvoimaisempia. Kasvatuksen lopussa tekemämme kontrollikasvatukset olivat vähemmän elinvoimaiset. Tämä tukee käsitystämme alkoholin vaikutuksesta hiivan kasvuun elinkiertokasvatuksessa (ks. Brown ym. 1981) ja (kpl. 1.3.2). Koska erot tekemissämme kontrollikasvatuksissa verrattuna Murakami ym. 2008 tekemiin kasvatuksiin ovat pienet etenkin kasvatuksen lopussa, tukee tämä saamiemme tulosten luotettavuutta.

Koska tekemämme koejärjestelyt oli tehty keskenään identtisesti, pystymme vertaamaan elinvoimaisuutta kuvaavia arvoja keskenään kasvatuksen loppupuolella, jolloin etanolin lisäyksestä johtunut kasvu oli loppunut. Tämä tuki hyvin tutkimustamme, koska olemme kiinnostuneita hiivan elinkierron loppupuolella tapahtuvasta elinvoimaisuuden muutoksesta.

Käytimme elinvoimaisuutta mittaavina arvoina OD₆₀₀ 08-arvoja. OD₆₀₀-arvojen kuvaajat olivat epäsäännöllisen mallisia (ks. kuvat 14 ja 16) ja niillä ei pelkästään pystytä kuvaamaan hiivan kasvua kaikissa kasvatuksissa. Tämän vuoksi käytimme elinvoimaisuutta kuvaamaan myös auc_I-arvoja (Tonner ym. 2017, Sprouffske 2018). Tämä poikkesi Murakami ym. 2008 käyttämästä menetelmästä.

5.2.1 Elinkiertotesti I α -synukleiinisairausmalli

Elinkiertotesti I tuloksista indusoidulla α -synukleiinisairausmallilla (Khurana & Lindquist 2010) tehdyistä Bioscreen-kasvatuksista voidaan havaita, että yhdisteen vaikutuksessa oleva kasvusto on pidempään elinkykyisempi kuin ilman yhdistettä kasvanut (ks. kuva 11 ja 13).

Samaa ei ollut havaittavissa staattisissa spottitesti kasvatuksissa (ks. kuva 10). Tästä voidaan päätellä, että sekoituksella ja SBC003-yhdisteellä voi olla elinvoimaisuutta parantava yhteisvaikutus α -synukleiinisairausmallin hiivasoluilla. Tästä testistä tarvitaan toistokokeita lopullisten johtopäätösten tekemiseksi.

5.2.2 Elinkiertotesti I FUS-sairausmalli

Indusoiduissa FUS-sairausmallin hiivakasvustoissa (Sun ym. 2011), jotka kasvoivat SBC003-yhdisteen kanssa, auc_I-arvot olivat kasvatuksen lopussa suurempia kuin ilman yhdistettä kasvaneissa kasvustoissa. Tästä voidaan päätellä, että SBC003-yhdisteen vaikutuksessa kasvaneet kasvustot olivat huomattavasti elinvoimaisempia, joka viittaisi siihen, että SBC003-yhdisteellä saattaisi olla pelastava vaikutus haitallisia FUS-proteiiniaggregaatteja vastaan (ks. kuva 14 vertaa kaavioita (A) ja (B)). Lisäksi vertaamalla kuvaa 14 kuvaan 15 havaitaan, miten suuri merkitys *FUS*-sairausgeenin toiminnalla on hiivan kasvuun. Tämä tukee spottitesteissä havaittuja tuloksia (ks. kuva 10).

5.3 SBC003-yhdisteen vaikutusten arviointi solujen ikääntymiseen

Villillä hiivakannalla tehdyistä elinkiertotesteistä I ja II havaitaan, että yhdisteen kanssa kasvatetuilla kannoilla elivoimaisuus säilyy pidempään verrattuna ilman SBC003-yhdistettä kasvaneisiin.

SBC003-yhdisteen kanssa kasvu on hitaampaa alussa mutta kasvatuksen loppupuolella elinvoimaisuus näyttäisi säilyvän pidempään (ks. kuvat 17 ja 18). Tämä voi olla merkki siitä, että yhdiste rajoittaisi liiallista kasvua kasvatuksen alkupuolella. Näyttäisi siltä, että yhdiste myös vahvistaisi solujen elinkykyä kasvatuksen elinkaaren loppupuolella. Tämä tukee käsitystä SBC003-yhdisteen ikääntyvien solujen elinkykyä parantavasta vaikutuksesta. SBC003-yhdisteen vaikutus elinvoimaisuuden vahvistajana tulee näkyviin vasta kasvatuksen lopussa, kauan viimeisen SBC003-yhdisteen lisäyksen jälkeen. Tästä voidaan päätellä, että SBC003-yhdisteellä olisi pitkäkestoinen vaikutus soluihin (ks. kuvat 17 ja 18).

Tehdyt elinkiertotestien tulokset villillä hiivakannalla (ks. luku 4.2.2) tukevat hyvin aikaisemmin tehtyä tutkimusta SBC003-yhdisteen haitallisten ikääntymisestä johtuvien proteiiniaggregaattien muodostumisen hidastavasta vaikutuksesta (ks. Caudron. julkaisematon tulos) ja vahvistaa käsitystä tämän yhteydestä solun elinkykyä parantavaan vaikutukseen (ks. kuva 18).

Kiinnostavia solun mekanismeja, joihin SBC003-yhdisteen vaikutus voisi perustua, ovat proteiinien laskostumiseen liittyvien järjestelmien ja proteiiniaggregaattien kertymiseen liittyvien mekanismien toiminta (ks. luku 1.3) (Saarikangas & Barral 2015).

Lisäksi olisi hyvä tutkia myös DNA:n korjausmekanismeihin liittyviä vaikutuksia (Wang 2013).

Mielenkiintoista olisikin tutkia minkä geenin, geenien tai epigeneettisen säätelyn toiminnasta johtuu testeissä havaittu solujen parantunut

elinvoimaisuus.

Mutaatioanalyysillä voitaisiin tutkia mihin geeneihin ja niiden koodaamiin proteiineihin yhdiste vaikuttaa (ks. kpl. 1.2). Hiivassa on 24 geeniä, jotka vähentävät *FUS*-geenin muodostamien proteiiniaggregaattien haitallisuutta ja kymmenen geeniä, jotka lisäävät niitä (Sun ym. 2011). Nämä geenit voisivat olla hyviä kohteita mutaatio- ja/tai epigeneettisen analyysin tekemiseksi, jonka perusteella voitaisiin selvittää SBC003-yhdisteen vaikutusmekanismi.

SBC003-yhdisteellä voi olla sellainen vaikutus, että mutatoituneesta *FUS*-geenistä muodostuneen proteiiniaggregaatin haitallisuus vähenee.

Yhdisteen vaikutus mutanttikantaan voi perustua myös suoraan *FUS*-geenin toimintaan esimerkiksi vähentämällä geenin ilmenemistä.

5.4 Tilastollinen arviointi

Arvioidaan villityyppisten hiivasolujen elinkiertokasvatuksista saatujen tulosten tilastollista merkitsevyyttä. Verrataan Bioscreen-ajosta saatuja tuloksia, jotka oli otettu SBC003-yhdistettä sisältävistä kasvustoista ja kontrollikasvatuksista elinkiertokasvatuksen lopuksi 31- ja 34-päivänä (ks. kuva 18).

Teimme elinkiertotestin soveltaen Murakami & Kaerberlein 2009 artikkelissa olevaa ohjetta. Ohjeesta poiketen käytimme datan analysoinnissa auc_I -arvoa (Tonner ym. 2017, Sprouffske 2018). Käytimme työssä elinvoimaisuutta mittaavana arvona myös Bioscreen datasta saatuja OD_{600} 0,8-arvoja, jotka indikoivat solujen elinvoimaisuutta kasvatuksissa. OD_{600} 0,8-arvojen siirtymisellä voidaan tarkastella, kuinka paljon solujen elinvoimaisuus on muuttunut kasvatuksen aikana (Murakami & Kaerberlein 2009).

Aikaisempien tutkimusten pohjalta voidaan olettaa, että yhdisteellä on vaikutusta solujen elinvoimaisuuteen (Caudron, julkaisematon tulos).

Tämän vuoksi valitsimme auc_I OD_{600} 0,8-arvojen tarkastelussa oletetuksi H_0 että yhdisteellä ei ole vaikutusta elinvoimaisuuteen ja valitsimme hypoteesin hylkäämisen rajaksi 0,05. Saimme OD_{600} 0,8-arvolla p-arvoksi 34-päivän kasvatuksesta 0,0048, ja 31-päivän kasvatuksesta p-arvoksi 0,0444. Saimme auc_I -arvoista 34-päivän p-arvoksi 0,028 mikä on alle 0,05. Tällöin H_0 oletus hylätään ja H_1 astuu voimaan näissä aikapisteissä. Tämä tulos on tilastollisesti merkittävä (Mellin 2006). Myös muissa aikapisteissä näyttäisi olevan selkeä suuntaus auc_I -arvoissa sekä OD_{600} 0,8-arvoissa, että SBC003-yhdisteen kanssa olevan kasvatuksen elinvoimaisuus on parempi (ks. kuva 18 (B)). Nämä tulokset viittaavat siihen, että SBC003-yhdistellä on tilastollisesti merkittävä parantava vaikutus solujen elinvoimaisuuteen elinkiertokasvatuksen lopussa (ks. kuva 18). Myös elinkiertotesti I:n 33- ja 28-päivän kasvatuksissa näyttäisi olevan suuntaus, että SBC003-yhdisteen kasvatukset olisivat elinvoimaisempia kuin ilman yhdistettä kasvaneet (ks. kuva 18). Tuloksista havaitaan, että erot kasvatuksien välillä kasvavat solujen

ikäntyessä kasvatuksen loppupuolella. SBC003-yhdisteen kanssa kasvaneet säilyvät pidempään elinkykyisempänä verrattuna kontrollikasvatuksiin (ks. kuvat 17 ja 18).

Sama suuntaus voidaan havaita myös α -synukleiini- ja FUS-sairausmallien elinkiertoikasvatusten tuloksista (ks. kuvat 11-16).

Auc_I-arvo kuvaa hyvin myös hiivan elinvoimaisuutta, koska se kuvaa Bioscreen-kasvatuksen kasvukäyrän mahdollista maksimi kokonaispinta-alaa.

Teimme elinkiertoikasvatuksista neljä identtistä toistoa (ks. kuva 7 ja 8), joista jokaisesta ottamastamme näytteestä tehtiin 3 replikaattia. Identtisten toistokokeiden välillä ei ollut merkittävää eroa.

Tekemissämme testeissä toistojen määrä on pieni, siksi saatujen tulosten perusteella voidaan saada alustavia arvioita ja tilastollisesti täysin luotettavien tuloksien saamiseksi täytyisi tehdä lisää toistokokeita. Koska hiivan kasvua seurataan pitkällä aikavälillä ja näytteitä otetaan monessa eri aikapisteessä, eri ajankohtana otetut näytteistä saadut arvot ovat saman suuntaisia ja siksi tukevat toisiaan. Tämän vuoksi menetelmä on suhteellisen luotettava. Replikaateista saadut arvot olivat yhteneväiset ja siksi tukevat myös testien luotettavuutta. IPSC-sairausmalleista saadut tulokset tukevat myös hyvin hiivamalleilla saatuja tuloksia.

5.5 Virhelähteiden arviointi

Mittaustuloksiin virheitä saattavat aiheuttaa pipettien epätarkat tilavuudet ja spektrometrien OD₆₀₀-mittaukset.

Huolellisesta steriilistä työskentelystä huolimatta hiivakontaminaatiot saattavat aiheuttaa virheitä mittaustuloksiin.

Hiivakontaminaatiota on vaikea havaita alustasta, koska kontaminaatiota aiheuttavan kannan fenotyyppi saattaa olla niin samankaltainen kuin käyttämämme kannan fenotyyppi.

Joistakin kasvatuksista havaittiin kuitenkin selkeästi, että ne olivat kontaminoituneet ja poistimme ne tuloksista.

Ravintoalusta on otollinen myös kontaminaatiota aiheuttaville toisille hiivalajeille. Indusoidut sairausmallikannat kasvavat huomattavasti huonommin johtuen sairausfenotyypistä kuin villityyppiset kannat.

Villityypisiä hiivakantoja esiintyy yleisesti ympäristössä. Näistä syistä johtuen kasvusto on alttiina kontaminoitumiselle.

Myös bakteerikontaminaatiot saattavat aiheuttaa virheitä mittaustuloksiin. Hiivalle on luonteenomaista kasvaa symbioosissa eri bakteerikantojen kanssa. Kontaminaatioita saattaa olla vaikea havaita, mikäli bakteerit elävät symbioosissa hiivan kanssa aiheuttamatta havaittavaa muutosta ilmiäsuun. Tämä saattaa altistaa hiivakasvatusta bakteerikontaminaatioille.

Biologisiin prosesseihin vaikuttavat aina monet tekijät, jotka voivat

vääristää tuloksia. Näiden tekijöiden aiheuttamia virheitä tuloksiin pyrimme välttämään hyvällä tasalaatuisella steriilillä työskentelyllä sekä käyttämällä erityyppisiä kontrollikasvatuksia, ja tarkastamalla mikroskoopilla kasvuston oikean ilmiasun, kun havaitsimme kasvustoissa poikkeavaa kasvua.

Tulevissa testeissä olisi hyvä varmentaa hiivasairausmallien ilmiasu kaikissa kasvatuksissa mikroskopoimalla ja / tai galaktoosi induktiotestillä. Tällä tavalla voitaisiin havaita haitalliset proteiiniaggregaatit hiivasoluissa ja varmistaa solujen oikea ilmiasu.

Lisätyn alkoholin vaikutusta tautimallikantojen elinkykyyn olisi aiheellista testata.

Lisäsimme SBC003-yhdisteen kanssa etanolia kasvatukseen yhteensä 110 μ M. Kokeissamme lisäsimme alkoholia saman verran myös kontrollikasvatuksiin, jolloin tutkimustuloksista on helppo erottaa SBC003-yhdisteen vaikutus alkoholin mahdollisesta vaikutuksesta.

5.6 Yhteenveto SBC003-yhdisteen vaikutusten arvioinnista

Havaitsimme spottitesteissä (ks. kuva 10), että yhdisteellä saattaa olla lievä pelastava vaikutus FUS-sairausmallin solujen elinvoimaisuuteen.

Elinkiertotestissä havaitsimme voimakkaamman vaikutuksen FUS-tautimallin elinvoimaisuuteen (ks. kuvat 14, 15 ja 16).

Lisäksi havaitsimme SBC003-yhdisteen yhteyden solun pidentyneeseen elinikään (ks. kuvat 17 ja 18).

Tekemämme tutkimus tukee käsitystä, että *FUS*-geenin ja sen koodaama proteiini ovat merkittävässä roolissa solun eri toimintojen säätelyssä, ja että sillä on vaikutusta myös solujen elinvoimaisuuteen (Vance ym. 2009).

Nämä edellä esitetyt elinkiertoikasvatusten tulokset FUS ja α -synukleiinisairausmalleilla tukevat käsitystä SBC003-yhdisteen haitallisilta proteiiniaggregaateilta pelastavasta vaikutuksesta, ja kineettisten kokeiden pohjalta tekemäämme oletusta haitallisten proteiiniaggregaattien kasvavasta haitallisesta vaikutuksesta elinkaaren loppupuolella.

Tulokset tukevat erittäin hyvin toisiaan ja ovat yhteneväisiä aikaisempien tutkimustuloksien kanssa.

Olisi hyvä verrata tuloksiamme tarkemmin muilla malliorganismeilla saatuihin tuloksiin. Tällä tavalla saataisiin selville, miten hiivamallit poikkeavat muista sairausmalleista SBC003-yhdisteen vaikutuksen suhteen.

Lisäksi olisi hyvä saada tutkimustietoa, miten SBC003-yhdiste vaikuttaa ihmiseen.

Vertaamalla kuvia 13, 16 ja 18 keskenään havaitaan, että hiililähteellä on merkitystä kasvuun. Sairaus mallien kontrollikasvatuksista, joissa oli raffinoosi hiililähteenä havaitaan, että ne ovat elinvoimaisempia kuin glukosissa kasvaneet villityypin kannat.

Tarkasteltaessa Yao ym. 2015 Kuvaa 1 havaitaan että myös heidän

villityypin kasvatus eli pidempään galaktoosi ja raaffinoosi kasvualustalla kuin glukoosikasvualustalla.

Tuloksiamme ei kuitenkaan voida kaikilta osin verrata aikaisempiin tutkimustuloksiin, koska vastaavanlaista tutkimusta ei ole tehty.

Mikäli tuloksemme pystytään varmentamaan ja SBC003-yhdisteellä on vaikutusta näin merkittävän geenin sekä tämän tuotteiden toimintaan, luo se loistavia mahdollisuuksia SBC003-yhdisteen mahdollisiin tuleviin käyttösovelluksiin.

Yhdisteellä voi olla vaikutusta esimerkiksi ikääntymiseen liittyvien sairauksien hoidossa sekä ikääntymisestä johtuvien rappeumien vähentämisessä ja eliniän pidentymisessä.

Mielenkiintoinen kysymys on, vaikuttaako SBC003-yhdiste DNA:n korjausmekanismeihin ja mutaatioiden muodostumiseen sekä tätä kautta proteiiniagregaatteja moduloiviin geeneihin ja/tai geneettisiin elementteihin vähentäen ikääntymisen seurauksena syntyvien proteiiniagregaatteja tai niiden vaikutuksia solussa. Tämä saattaisi olla yksi mahdollinen syy tehdyissä kokeissa havaitusta ikääntyneen hiivasolun elinvoimaisuuden parantumisessa (ks. luku 4.2.2 kuva 18).

FUS-geeni on tärkeässä roolissa myös genomin vakauden ylläpitäjänä (Wang ym. 2013), jonka vuoksi sillä on merkitystä monen sairauden ehkäisijänä.

Hiivalla ja ihmisellä on monia saman tyyppisiä virheellisesti laskostuneita haitallisia *FUS*-proteiineja moduloivia geneettisiä (Sun ym. 2011). Siksi on mahdollista, että SBC003-yhdiste vaikuttaa näiden geenian toimesta *FUS*-proteiinin haitallisten proteiiniagregaatien vaikutusten vähentymiseen ja siihen, että nämä tulevat esiin hiivalla tekemissämme testeissä (ks. kuvat 18, 19 ja 20) ja IPS-soluilla tehdyissä testeissä (SunRegen Healthcare AG. julkaisematon tulos).

Virheellisesti laskostuneen *FUS*-proteiinin on havaittu olevan yhteydessä myös syövän syntymekanismeihin ja sen toiminta on yhteydessä genomin vakauteen, DNA:n korjausmekanismeihin ja geenien epigeneettiseen säätelyyn sekä ikääntymiseen.

Jos SBC003-yhdiste vaikuttaa DNA:n korjausmekanismeihin, voi se olla vaikuttavana tekijänä ehkä myös hermostorappeuma-IPS-solumalleissa.

Epigeneettisen säätelyn on havaittu olevan yhteydessä ihmisen ikääntymiseen ja moniin ikääntymiseen liittyviin hermostorappeumasairauksiin, kuten ALS, AD ja PD (Berson ym. 2018).

Havaitsimme, että villillä hiivakannalla SBC003-yhdisteen kanssa kasvanut kanta kasvoi hitaammin alussa mutta lopussa huomattavasti paremmin kuin SBC003-yhdisteen kanssa kasvanut kanta (ks. kuva 18), tämä saatta olla merkki siitä, että yhdiste tekee genomista vakaamman.

Genomin vakaus on tärkeä tekijä ikääntymisen vaikutusten vähenemisessä mutta myös monen ikääntymiseen yhdistettävän sairauden kuten neurodegeneratiivisten sairauksien ja syövän syntymisen ehkäisyssä.

Kiinnostava kysymys on parantaako SBC003-yhdiste *FUS*-geenin kautta genomia vakautta?

Tässä työssä havaittiin myös, että SBC003-yhdisteellä saattaa olla vaikutusta sairaus-*FUS*-hiivakannan parempaan elinvoimaisuuteen (ks. kuva 10 ja 18).

Mikäli nämä pystytään varmentamaan toistokokeilla, nousee kiinnostava kysymys, onko SBC003-yhdisteellä vaikutusta myös syövän syntymisen ehkäisijänä tai jo sairastuneen potilaan hoidossa?

Silloin SBC003-yhdisteen vaikutusta syövän syntymisen ennaltaehkäisyyn tai sairauden lääkitsemiseen kannattaisi tutkia tarkemmin.

Tutkimus voitaisiin aluksi tehdä hiiva sairausmallin soluilla ja ihmisen syöpä sairausmallin soluilla sekä tämän jälkeen nisäkäskokeilla.

Monet ravintoaineet vaikuttavat epigeneettisten geenien säätelymekanismien kautta ikääntymiseen ja eri syöpämuotojen kehittymiseen (Liua et al. 2003, Nyström & Mutanen 2009).

SBC003-yhdiste on yrtistä eristetty molekyyli (SunRegen Healthcare AG. julkaisematon tulos), joka on myös ravintoaine. Tämä voi vaikuttaa epigeneettisiin säätelymekanismeihin ja edelleen proteiiniaggregaattien muodostumiseen vähentäen sairauksien haitallisia vaikutuksia ja myös vähentäen ikääntymiseen liittyviä rappeuttavia vaikutuksia.

SBC003-yhdisteen vaikutus epigeneettisen säätelyn kautta parempaan genomia vakauteen saattaa olla yksi syy, josta havaittu kasvatuksien elinvoimaisuutta parantava vaikutus johtuu (ks. kuva 10 ja 18).

Havaitsimme hiivalla tekemissämme testeissä selkeän eron aiemman iPS-soluilla tehdyn tutkimuksen kanssa. Tämä todennäköisesti johtui siitä, että hiiva ja nisäkässolut poikkeavat epigeneettisesti toisistaan. Tämän vuoksi olisi syytä tutkia lisää yhdisteen vaikutusta hiivan ja ihmisen soluihin epigeneettisesti.

Lisäksi voitaisiin testata ddPCR-menetelmällä iPS-solulinjoihin kiinnostavimpien potentiaalisten kohdegeenien ilmenemistä SBC003-yhdisteen vaikutuksessa ja ilman yhdistettä.

Tuloksista voisi olla mahdollista päätellä, onko yhdisteellä vaikutusta minkä geenin / geenien ilmenemistasoihin, ja tätä kautta olisi mahdollista saada selville SBC003-yhdisteen toimintamekanismi. Yhdisteellä voisi olla vaikutusta miRNA (mikro-RNA) -säätelyyn, ja tätä kautta geenien ilmenemiseen ja proteiinien laskostumiseen.

Usean miRNA:n on havaittu olevan yhteydessä *FUS*-geenin aktiivisuuden vähenemiseen syöpäkasvaimissa (Rimkus ym. 2017). Tämän vuoksi olisi kiinnostavaa testata SBC003-yhdisteen vaikutusta tutkimuksessa havaittuihin miRNA:ihin.

Mielenkiintoista olisi myös testata, mihin SBC003-yhdisteen vaikutus geneettisellä tasolla perustuu. Perustuuko yhdisteen vaikutus siihen, että se hiljentää geneettisen tai epigeneettisen säätelyn avulla haitallisia proteiiniaggregaatteja muodostavien geenien toimintaa tai lisää haitallisten

proteiiniaggregaatteja vähentävien geenien toimintaa?

SBC003-yhdiste saattaa myös vaikuttaa haitallisten proteiiniaggregaattien vaikutusta muuttavien geenien säätelyyn. Lisäksi on hyvä huomioida eettinen näkökulma. Kokeet leivinhoivalla ovat eettisesti hyväksyttävämpiä kuin nisäkäsmalliorganismeilla.

Leivinhoivalla voi olla mahdollista korvata osa nisäkäskokeista (Santos ym. 2012).

Tämä tutkimus jätti avoimeksi monta mielenkiintoista kysymystä SBC003-yhdisteestä sekä monta mahdollista tutkimuslinjaa SBC003-yhdisteen vaikutusten tutkimiseksi, ja lisää SBC003-yhdisteen vakuuttavuutta toimivana lääkemolekyylinä. Tämä työ lisää myös hiivan kiinnostavuutta malliorganismina lääkkeiden molekulaaristen mekanismien tutkimuksessa ja on siksi merkittävä.

6 KIITOKSET

Tämä pro gradu -tutkielman kokeellinen osuus tehtiin HiLIFE Juha Saarikankaan laboratoriossa.

Haluan kiittää apulaisprofessori Juha Saarikangasta työn ohjauksesta sekä tohtoriopiskelijoita Jurgita Paukštytė ja Pinja Kettusta työssä tarvittavien ohjelmien käyttöopastuksesta.

7 LÄHDELUETTELO

Aguzzi, A. 1. & Lakkaraju, A.A. K. Cell Biology of Prions and Prionoids. 2016. Trends in Cell Biology.:doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.007.

Aitman, T.J., Boone, C., Churchill, G.A., Hengartner, M. O., Mackay, T. F. C. & Stemple, D. L. 2011. The future of model organisms in human disease research. Nature Reviews Genetics volume 12, pages 575–582.

Allen, D. D., Caviedes, R., Cárdenas, A. M., Shimahara, T., Segura-Aguilar, J. & Caviedes, P. A., 2008. Cell Lines as In Vitro Models for Drug Screening and Toxicity Studies. Pages 757-768. doi.org/10.1080/03639040500216246.

Anfinsen, C. B. 1973. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. Science. Volume 181, Number 4096 pp. 223-230. DOI: 10.1126/science.181.4096.223.

Balch, W. E., 1, Morimoto, R.I. 2, Dillin, A., 3 & Kelly, J., W., 4,* 2008. Adapting Proteostasis for Disease Intervention. Science. Vol. 319, Issue 5865, pp. 916-919 DOI: 10.1126/science.1141448.

Berson, A., 1, Nativio, R., 2, Berger, S. L. 1, 2 & Bonini, N. M. 1. 2018. Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. Trends in Neurosciences. Volume 41, Issue 9, September. 2018. Pages 587-598. https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.05.005.

Beyer, K.,* Domingo-Sábat, M. & Ariza, A. 2009. Molecular Pathology of Lewy Body Diseases. International Journal of Molecular Sciences. doi: 10.3390/ijms10030724.

Bharadwaj, P., 1, 2, Martins, R. 1, 3, 4 & Macreadie, I. 1, 5. 2010. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. FEMS Yeast research. DOI:10.1111/j.1567-1364.2010.00658.x

Botstein, D. & Fink, G. R. 2011. Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics*. doi: 10.1534/genetics.111.130765.

Breyer, M. D. A, Look, T. & Cifra, A. 2015. From bench to patient: model systems in drug discovery. *Disease Models & Mechanisms* 8: 1171-1174; doi: 10.1242/dmm.023036.

Burré, J.*. 2015. The Synaptic Function of α -Synuclein. *J Parkinsons Dis.*; 5(4): 699–713. doi: 10.3233/JPD-150642.

Byers, B., Lee, H.-I., Pera, R. R. 2012. Modeling Parkinson's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, Volume 12, Issue 3, pp 237–242.

Camacho-Ruiz, L., 1, Pérez-Guerra, N., 2 & Roses, R. P. 3. 2003. FACTORS AFFECTING THE GROWTH OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN BATCH CULTURE AND IN SOLID STATE FERMENTATION. *EJEAFChe*.

Caraveo, G., Auluck, P.K., Whitesell, L., Chung, C.Y., Baru, V., Mosharov, E.V., Yan, X., Ben-Johny, M., Soste, M. & Picotti, P. 2014. Calcineurin determines toxic versus beneficial responses to alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111, E3544-3552. doi: 10.1073/pnas.1413201111.

Caudron F, Julkaisematon tulos.

Couthouisa, J.,a1, Hart, M.P.,a1, Shorterb, J.,1, DeJesus-Hernandezc, M., Eriona, R., Oristanoa, R., Liua, A. X., Ramosa, D.,d, Jethavaa, N.,d, Hosangadia, D.,e, Epsteina, J.,f, Chianga, A.,g, Diaz, Z. b,Nakayah, T., Ibrahimh, F., Kimi, H.-J., Solskij, J. A., Williamsj, K. L.,k, Mojsilovic-Petrovicl, J.,Ingrem, C., Boylann, K., Graff-Radfordn, N. R., Dicksonc, D. W., Clay-Falconeh, D.,o, Elmanp, L.,McCluskeyp, L., Greeneh, R.,o, Kalbl, R. G., Leeh, V. M.-Y.,o, Trojanowskiah, J.Q.,o, Ludolphq, A., Robberechtr, W., Andersenm, P.M., Nicholsonj, G.A.,k, Blairj, I. P.,k, Kings, O. D., Boninii, N. M.,Van Deerlinh, V.,o, Rademakersc, R., Mourelatosh, Z. &

Gitlera, A. D.,2. 2011. A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes. PNAS. doi/10.1073/pnas.1109434108.

Cruts, M. 1,2,5, Gijselinck, I. 1,2,5, van der Zee, J.1,2,5, Engelborghs, S.3,5,6, Wils, H.1,2,5, Pirici, D.1,2,5, Rademakers, R. 1,2,5, Vandenberghe R. 7, Dermaut, B. 9, Martin, J.4,5, van Duijn, C. 10, Peeters, K. 1,2,5, Sciot, R. 8, Santens, P.9, De Pooter, T.1,2,5, Mattheijssens, M.1,2,5, Van den Broeck, M.1,2,5, Cuijt, I.1,2,5, Vennekens, K.1,2,5, De Deyn, P.P.3,5,6, Kumar-Singh, S.1,2,5 & Van Broeckhoven, C.1,2,5. 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitinpositive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. Nature letters. 442, pages 920–924. doi:10.1038/nature05017.

Defossez, P.A., Prusty, R., Kaeberlein, M., Lin S.J., Ferrigno, P., Silver, P. A. 3, 4, Keil, R. L. 2 & Guarente, L.1999. Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. Mol Cell. 3: 447–455. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80472-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80472-4)

Di Gregorio, S. E. & Duennwald, M. L. 2018. Yeast as a model to study protein misfolding in aged cells. FEMS Yeast Research, Volume 18, Issue 6, September. foy054, <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy054>.

dos Santos, S.C. 1, Teixeira, M. C.,1,2 Cabrito, T. R., 1 & Sá-Correia, I. 1,2,* . 2012. Yeast Toxicogenomics: Genome-Wide Responses to Chemical Stresses with Impact in Environmental Health, Pharmacology, and Biotechnology. Front Genet; 3: 63. doi: 10.3389/fgene.2012.00063.

Drummond, A. D. 1 & Wilke, C. O. 2, PMC. 2009. The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. Nature Reviews Genetics. Volume 10, pages 715–724.

Duennwald, M.L., Jagadish, S., Muchowski, P.J. & Lindquist, S. 2006. Flanking sequences profoundly alter polyglutamine toxicity in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103, 11045-11050. DOI: 10.1073/pnas.0604547103.

Escusa-Toret, S.1, Vonk, W.I. & Frydman, J. 2013. Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nat Cell Biol.* 15(10):1231-43. doi: 10.1038/ncb2838.

Fabrizio, P. 1. & Longo, V. D. 2007. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological Aging*. DOI: 10.1007/978-1-59745-361-5_8.

Forman, M. S., Trojanowski, J. Q. & Lee V.M-Y. 2007. TDP-43: a novel neurodegenerative proteinopathy. *Current Opinion in Neurobiology*. Volume 17, Issue 5, Pages 548-555. doi.org/10.1016/j.conb.2007.08.005.

Fuchs, S. M. & Quasem, I. 2014. Budding yeast as a model to study epigenetics. *Drug Discovery Today: Disease Models*. Volume 12, Pages 1-6 <https://doi.org/10.1016/j.ddmod>.

Glickman, M.H.1 & Ciechanover, A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. doi.org/10.1152/physrev.00027.2001.

Goffeau, A.1, Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H, Galibert, F, Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science*. 25; 274 (5287):546, 563-7.

Guo, C.1, Sun, L. 2, Chen, X.3 & Zhang, D.4.2013. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Reserch*. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009.

Hartl, F. U.1, Bracher, A. & Hayer-Hartl, M.1.2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. Pages 324–332.

Hofer, S. 1, Kainz, K. 1, Zimmermann, A. 1,2, Bauer, M. A. 1, Pendl, T.1, Poglitsch, M. 1, Madeo, F. 1,3,* & Carmona-Gutierrez, D. 1,* .2018. Studying Huntington's Disease in Yeast: From Mechanisms to Pharmacological Approaches. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. doi: 10.3389/fnmol.2018.00318.

Israel, M. A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M. P, Van Gorp, S., Nazor, K. L., Boscolo, F. S., Carson, C. T., Laurent, L. C., Marsala, M., Gage, F. H., Remes, A. M., Koo, E.H. & Goldstein, L. S. B. 2012. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* volume 482, pages216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10821>.

Johnson, B.S., McCaffery, J.M., Lindquist, S. & Gitler, A.D. 2008. A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105, 6439-6444. doi 10.1073/pnas.0802082105.

Jucker, M. & Walker, L. C. 2013. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. Volume 501, pages 45–51. doi: 10.1038/nature12481.

Kachroo, A. H 1, Laurent, J. M. 1, Yellman, C. M. 1, Meyer, A. G. 1,2, Wilke, C. O. 1,2,3 & Marcotte, E.M. 1,2. 2015. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science*. Vol. 348, Issue 6237, pp. 921-925.DOI: 10.1126/science.aaa0769.

Kaeberlein, M. 2010. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*. 25; 464(7288): 513–519. doi: 10.1038/nature08981.

Kaeberlein, M.1., Kirkland, K.T., Fields, S. & Kennedy, B.K.2004. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLOS biology*. doi.org/10.1371/journal.pbio.0020296.

Kaeberlein, M., McVey & M., Guarente, L. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes. Dev* 13: 2570–2580. DOI: 10.1101/gad.13.19.2570.

Kennedy, B. K. 1, Berger, S. L. 2, 3, Brunet, A. 4, 5, Campisi, J. 1, 6, Cuervo, A. M. 7, 8, Epel, E. S. 9, Franceschi, C. 10, 11, 12, Lithgow, G. J. 1, Morimoto, R. I. 13, Pessin, J. E. 14, Rando, T. A. 5, 15, 16, Richardson, A. 17, 18, Schadt, E. E. 19, Wyss-Coray, T. 15, 16, Sierra, F. 20. 2014. Geroscience: Linking Aging to Chronic Disease. *Cell*. Volume 159, Issue 4, 6 N, Pages 709–713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039>.

Khurana, V. & Lindquist, S. 2010. Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nature Reviews*. doi:10.1038/nrn2809.

Kivipelto, M., Mangialasche, F. & Ngandu, T. 2018. Nature Reviews Neurology. Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. Volume 14, pages 653–666. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0070-3>.

Knobloch, M., Konietzko, U., Krebs, D. C. & Nitsch, R. M. 2007. Intracellular A β and cognitive deficits precede β -amyloid deposition in transgenic arcA β mice. *Neurobiology of Aging*. Volume 28, Issue 9, Pages 1297–1306. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.06.019.

Krammer, C.,†, Schätz, H. M. I, & Vorberg, I. 2009. Prion-like propagation of cytosolic protein aggregates Insights from cell culture models. *Prion* 3(4): 206–212. doi.org/10.4161/pri.3.4.10013.

Lagier-Tourenne, C. 1n & Cleveland, D. W. 1. 2009. Rethinking ALS: The FUS about TDP-43. *Cell*. Volume 136, Issue 6, 20. doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.006.

<http://leelab.uchicago.edu/>. Luetttu 10.5.2019.

Lee, S-J. a,c,* , Lim, H-S a,c Masliah, E.,d & Leeb, H-J c. 2011. Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: Problems and perspectives. *Neurosci Res.* Aug; 70(4): 339–348. doi: 10.1016/j.neures.2011.05.008.

Lee, V. M-Y. 1., Goedert, M.2 & Trojanowski, J. Q. 1.2001. Neurodegenerative Tauopathies. *Annual Review of Neuroscience.* Vol 24:1121-1159.

Li, L., Miles, S., Melville, Z.,* Prasad, A., Bradley, G. & Breeden, L. L.1. 2013. Key events during the transition from rapid growth to quiescence in budding yeast require posttranscriptional regulators. *Mol Biol Cell.* Dec 1; 24(23): 3697–3709. doi: 10.1091/mbc.E13-05-0241.

Liua, L., Wyliea, R. C., Andrews, L. G. & Tollefsbol, T. O.2003. Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mechanisms of Ageing and Development.* Volume 124, Issues 10–12, Pages. 989-998. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2003.08.001>.

Lobo, I. (2008) Environmental influences on gene expression. *Nature Education* 1(1):39

Maynard, S. 1, Fang, E. F. 2. Scheibye-Knudsen, M., 2 Croteau, D. L. 2 & Bohr, V.A. 1,2. 2015. DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Oct; 5(10): a025130. doi: 10.1101/cshperspect.a025130.

Mason, R. P. & Giorgini, F. 2011. Modeling Huntington disease in yeast: Perspectives and future directions. *Prion.* doi.org/10.4161/pri.18005.

Mellin, I. 2006. math.aalto.fi/opetus/sovtoda/oppikirja/Testit.pdf, luettu 5.5.20.

Mensaert, K., Denil, S., Trooskens, G., Van Crielinge, W., Thas, O. & De Meyer, T. 2013. Next-generation technologies and data analytical approaches for epigenomics. <https://doi.org/10.1002/em.21841>.

Morimoto, R. I. 1. 2008. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes*. doi/10.1101/gad.1657108.

Morimoto, R. I., Nollen, E. A.A. 2003. The Heat-Shock Response: Sensing the Stress of Misfolded Proteins. in *Handbook of Cell Signaling*.

Morita, M., Al-Chalabi, A., Andersen, P. M., Hosler, B., Sapp, P., Englund, E., Mitchell, J. E., Habgood, J. J., de Belleruche, J., Xi, J., Jongjaroenprasert, W., Horvitz, H. R., Gunnarsson, L-G. & Brown, R. H. 2006. A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology*. DOI: doi.org/10.1212/01.wnl.0000200048.53766.b4.

Moskalev, A. & Vaiserman, A. M. 2017. *Epigenetics of Aging and Longevity*. Volume 4 .1st Edition.

Murakami, C. J. 1, Burtner, C. R. 2, Kennedy, B. K. 2 & Kaerberlein, M. 1. 2008. A Method for High-Throughput Quantitative Analysis of Yeast Chronological Life Span. *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCE*. Vol. 63A, No. 2, 113–121.

Murakami, C. & Kaerberlein, M. 2009. Quantifying Yeast Chronological Life Span by Outgrowth of Aged Cells. *J. Vis. Exp.* (27), e1156. *Journal of Visualized Experiments*. doi:10.3791/1156.

Nyström, M. & Mutanen, M. 2009. Diet and epigenetics in colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 15(3): 257-263. doi: 10.3748/wjg.15.257.

Outeiro, T. F. 1 & Giorgini, F. 2006. Yeast as a drug discovery platform in Huntington's and Parkinson's diseases. *Biotechnology Journal*. Volume 1, Issue 3. DOI: 10.1002/biot.200500043.

Parrella, E. & Longo, V. D. *. 2008. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease. *Methods*. Volume 46, Issue 4. doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.10.004.

Peggion, C., Sorgato, M. C. & Bertoli, A. *. 2014. Prions and Prion-Like Pathogens in Neurodegenerative Disorders. *Pathogens*. 3(1), 149-163; doi.org/10.3390/pathogens3010149.

Pelham, H. R. B. 1989. CONTROL OF PROTEIN EXIT FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM. *Rev. Cell Biol.* 5: 1-23. DOI: 10.1146/annurev.cb.05.110189.000245.

Piper, P. W. 2006. Long-lived yeast as a model for ageing research: DOI: 10.1002/yea.1354.

Polymenidou, M. & Cleveland D.W. 2012. Prion-like spread of protein aggregates in neurodegeneration. *Journal of Experimental medicine*. DOI: 10.1084/jem.20120741.

Prasad, A. †, Bharathi, V. †, Sivalingam, V., Girdhar, A. & Patel, B. K. 2019. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* doi.org/10.3389/fnmol.2019.00025.

Rabbitts, T.H., Forster, A., Larson, R. & Nathan, P. 1993. Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nature Genetics*. Volume 4, pages 175–180. DOI: 10.1038/ng0693-175.

Ramón, A., Señorale-Pose, M. & Marín, M. *.2014. Inclusion bodies: not that bad... *Frontiers of Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2014.00056.

Relini, A. 1,2,†, Marano, N. 1,3,† and Gliozzi1, A. †*.2013. 2014. Misfolding of Amyloidogenic Proteins and Their Interactions with Membranes. *Biomolecules*. doi: 10.3390/biom4010020.

Reynaud, E. 2010. Protein Misfolding and Degenerative Diseases. *Nature Education*. 3(9):28.

Rimkus, T. 1, Sirkisoon, S. 1, Harrison, A. 1 & Lo, H-W. 1,2. 2017. Tumor Suppressor Candidate 2 (TUSC2; FUS-1) and Human Cancers. *Discov Med*. 23(128): 325–330.

Saarikangas, J.1 & Barral, Y.1, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Switzerland. 2015. Protein aggregates are associated with replicative aging without compromising protein quality control. *eLIFE*. DOI: 10.7554/eLife.06197.

Saarikangas, J.1, 2, 3, 4 & Caudron, F.5. 2012. Spatial regulation of coalesced protein assemblies: Lessons from yeast to diseases. *Prion*. doi.org/10.1080/19336896.2017.1322239.

Saarikangas, J., Caudron, F., Prasad, R., Bolognesi, A., Aldea, M. & Barral, Y. 2017. Compartmentalization of ER-Bound Chaperone Confines Protein Deposit Formation to the Aging Yeast Cell. *Current Biology*. DOI:https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.069.

Sanders, R. 1 , 2 , * Mason, D.J. 2, Foy, C. A. 1 & Huggett, J. F. 1. 2013. Evaluation of Digital PCR for Absolute RNA Quantification. *PLoS One*. 2013; 8(9): e75296. doi: 10.1371/journal.pone.0075296.

Selkoe, D. J. 1 & Wolfe, M. S.1. 2007. Running with Scissors in the Membrane. *Cell*. Volume 131, Issue 2, 19, Pages 215-221. doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.012.

Sinclair, D.A. & Guarente, L. 1997. Extrachromosomal rDNA circles—A cause of aging in yeast. *Cell*. 91: 1033–1042. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80493-6.

Sprouffske, K. 2018. Using Growthcurver. <https://cran.r-project.org/web/packages/growthcurver/vignettes/Growthcurver-vignette.html>. Luettu 10.3.2020.

SunRegen Healthcare AG. julkaisematon tulos.

Sun, Z., Diaz, Z., Fang, X., Hart, M. P., Chesi, A., Shorter, J. & Gitler, A. D. 2011. Molecular Determinants and Genetic Modifiers of Aggregation and Toxicity for the ALS Disease Protein FUS/TLS. *PLOS biology*. doi.org/10.1371/journal.pbio.1000614.

Takalo, M., Salminen, A., Soininen, H., Hiltunen, M. & Haapasalo, A. 2013. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis.*; 2(1): 1–14. PMCID: PMC3601466.

Tenreiro, S., Munder, M. C., Alberti, S. & Outeiro, T. F. 2013. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*. doi.org/10.1111/jnc.12271.

Thomas, P., Sekhar, A. C., Upreti, R., Mujawar, M.M. 1 & Pasha, S. S. 2015. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnol Rep*. doi: 10.1016/j.btre.2015.08.003.

Tonner, P. D. 1,2, Darnell, C. L. 2, Engelhardt, B. E. 3 & Schmid, A. K. 1,2. 2017. Detecting differential growth of microbial populations with Gaussian process regression. *Genome Res*. 27(2): 320–333. doi: 10.1101/gr.210286.116.

Treusch, S. 1,2, Hamamichi, S. 1,3, Goodman J. L. 1, Matlack, K. E. S. 1,2, Chung, C. Y. 1, Baru, V. 1,2, Shulman, J. M.4,5, Parrado, A. 6, Bevis, B. J. 1, Valastyan, J. S. 1,2, Han, H. 1, Lindhagen-Persson, M. 7, Reiman, E. M 8,9, Evans, D. A. 10, Bennett, D. A. 11, Olofsson, A. 7, Dejager, P.L. 4,5, Tanzi, R. E. 6, Caldwell, K. A. 3, Caldwell, G. A. 3 & Lindquist, S. 1,2,*

.2011. Functional Links Between A β Toxicity, Endocytic Trafficking, and Alzheimer's Disease Risk Factors in Yeast: 213210. Science. DOI: 10.1126/science.1213210.

Turkki, T. Pidempien elinkaarien yhteiskunta. 2013. Luettu 7.4.2019. <https://www.sitra.fi/artikkelit/pidempien-elinkaarien-yhteiskunta/>.

Uzhachenko, R.1, Boyd, K.2, Olivares-Villagomez, D.2, Zhu, Y.3, Goodwin, J. S.1, Rana, T.1,7, Shanker, A.1,5, Tan W.J.T.5, Bondar, T.6, Medzhitov, R.6 & Ivanova, A. V. 5. 2017. Mitochondrial protein Fus1/Tusc2 in premature aging and age-related pathologies: critical roles of calcium and energy homeostasis. Aging. 9(3): 627–648. doi:10.18632/aging.101213.

Vance, C.1.,*, Rogelj, B. 1,*, Hortobágyi, T. 1,*, De Vos, K. J. 2,*, Nishimura, A. L. 1, Sreedharan, J.1, Hu, 1 X., Smith, B. 1, Ruddy, D. 1, Wright, P. 1, Ganesalingam, J. 1, Williams, K. L. 3, Tripathi, V. 1, Al-Saraj, S. 1, Al-Chalabi, A. 1, Leigh, P. N. 1, Blair, I. P. 3,5, Nicholson, G.3,4,5, de Belleruche, J. 6, Gallo, J. 1, Miller, C. C. 1,2 & Shaw, C. E.1,†. 2009. Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. Science. Vol. 323, Issue 5918, pp. 1208-1211. DOI: 10.1126/science.1165942.

Vaux, D. L.2014. Basic Statistics in Cell Biology. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013303.

Villadsen, J., Nielsen, J., Lidén, G. 2011. Bioreaction engineering principles Third edition. Doi 10.1007/978-1-4419-4419-0688-6.

Wang, W-Y., Pan, L., Su, S. C., Quinn, E. J., Sasaki, M., Jimenez, J. C., Mackenzie, I.R. A, Huang, E. J. & Tsai, L. 2013. Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. Nature Neuroscience. Volume 16, pages 1383–1391. doi: 10.1038/nn.3514.

Watts, G. D. J. 1, Wymer, J. 1, Kovach, M. J. 2, Mehta, S. G. 1, Mumm, S. 3, Darvish, D.4, Pestronk, A. 5, Whyte, M. P.3 & Kimonis, V. E. 1. 2004. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and

frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature genetics* 36, pages 377–381. DOI: 10.1038/ng1332.

Zimmermann, A.1, Hofer, S.1, Pendl, T.1, Kainz, K.1, Madeo, F.1,2 & Carmona-Gutierrez, D.1. 2018. Yeast as a tool to identify anti-aging compounds. *FEMS. Yeast Res.* doi: 10.1093/femsyr/foy020.

Xie, J. L. 1 & Jarosz, D. F. 1,2,* . 2018. Mutations, protein homeostasis, and epigenetic control of genome integrity. *DNA Repair (Amst)*71: 23–32. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.08.004.